



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Rozdílné vlastnosti T regulačních buněk v pupečnickové krvi
novorozenců zdravých a alergických matek**

**Different characteristics of regulatory T cells in cord blood
of newborns of healthy and allergic mothers**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Leona Ondřejíková

Kladno 2017

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Akademický rok: 2016/2017

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Leona Ondřejíková**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Rozdílné vlastnosti T regulačních buněk v pupečnickové krvi novorozenců zdravých a alergických matek**
Téma anglicky: Different characteristics of regulatory T cells in cord blood of newborns of healthy and allergic mothers

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

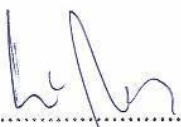
Předmětem bakalářské práce bude charakterizace T regulačních buněk pupečnickové krve novorozenců zdravých a alergických matek. V teoretické části se studentka zaměří na roli T regulačních buněk v patogenezi alergických onemocnění. Zpracuje dostupnou literaturu o možnosti využití T regulačních buněk jako možného prognostického znaku poukazujícího na zvýšené riziko vzniku alergických onemocnění a potencionálního využití T regulačních buněk při léčbě alergických onemocnění. Dále se zaměří na imunomodulační vlastnosti probiotik a jejich schopnosti zvyšovat počet či funkční vlastnosti T regulačních buněk. V praktické části se studentka zaměří na analýzu T regulačních buněk v pupečnickové krvi dětí zdravých matek (dětí s relativně nízkým rizikem vzniku alergie) a dětí alergických matek (dětí s relativně vysokým rizikem vzniku alergie) pomocí průtokové cytometrie.

Seznam odborné literatury:

- [1] HRDÝ, J., KOCOURKOVÁ I. a PROKEŠOVÁ L., Impaired function of regulatory T cells in cord blood of children of allergic mothers. *Clinical & Experimental Immunology*, Číslo 170(1), 2012, s.10-7, ISSN 1365-2249
[2] LODINOVÁ-ŽADNÍKOVÁ, R., PROKEŠOVÁ L., KOCOURKOVÁ I., HRDÝ J. a ŽIŽKA J., Prevention of Allergy in Infants of Allergic Mothers by Probiotic *Escherichia coli*. *International Archive of Allergy and Immunology*, Číslo 153(2), 2010, s. 201-6., ISSN 1423-0097
[3] HRDÝ, J., NOVOTNÁ O., KOCOURKOVÁ I. a PROKEŠOVÁ L., Gene Expression of Subunits of the IL-12 Family Cytokines in moDCs Derived In Vitro from the Cord Blood of Children of Healthy and Allergic Mothers. *Folia Biologica*, Číslo 60(2), 2014, s.74-82., ISSN 0015-5500

Zadání platné do: 11.09.2018

Vedoucí: RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.


vedoucí katedry / pracoviště


děkan

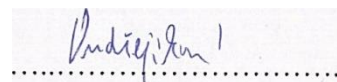
V Kladně dne 10.11.2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Rozdílné vlastnosti T regulačních buněk v pupečnickové krvi novorozenců zdravých a alergických matek vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 18.05.2017

A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink. The signature appears to be 'Ondřejíková' with a stylized flourish at the end. Below the signature is a dotted line.

Leona Ondřejíková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce - RNDr. Jiřímu Hrdému, Ph.D. za zpracování návrhu tématu práce, trpělivost, cenné rady a kritické, nýbrž konstruktivní připomínky. Poděkování patří i MUDr. Mgr. Viktoru Černému za trpělivost a pomoc při přípravě a následném měření analyzovaného materiálu.

Také děkuji pracovníkům Ústavu imunologie a mikrobiologie při 1. lékařské fakultě, Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za ochotu a umožnění realizace praktické části práce.

Abstrakt

Předmětem bakalářské práce je porovnání T regulačních buněk v pupečnickové krvi novorozenců zdravých a alergických matek.

Teoretická část bakalářské práce popisuje hlavní složky imunitního systému podílející se na rozvoji alergického onemocnění. Dále se zabývá vývojem fetálního imunitního systému se zaměřením na ontogenezi složek uplatňujících se při alergických onemocněních. Popisuje imunopatologickou reakci I. typu, obecně známou jako alergii. Poslední část je věnována T regulačním buňkám, jejich objevu, subpopulacím, jejich možnému využití jako prognostického znaku poukazujícího na zvýšené riziko rozvoje alergie, jejich funkci během patogeneze alergie, možnostem jejich terapeutického využití a schopnosti probiotik zvýšit jejich funkčnost.

Praktická část práce popisuje zkoumaný materiál, jeho přípravu na měření a analýzu průtokovým cytometrem.

Výsledky dokázaly, že T regulační buňky v pupečnickové krvi mají rozdílné vlastnosti u novorozenců zdravých a alergických matek. Signifikantní rozdíl byl zjištěn u mediánu intenzity fluorescence FoxP3 a u počtu indukovaných T regulačních buněk. Oba sledované parametry byly nižší v pupečnickové krvi dětí alergických matek, což poukazuje na nižší funkční vlastnosti T regulačních buněk a nižší vyzrálост imunitního systému novorozenců alergických matek.

Klíčová slova

T regulační buňky; imunitní systém; alergie; IgE; pupečnicková krev; průtoková cytometrie

Abstract

The subject of the bachelor thesis is the comparison of T regulatory cells in cord blood newborns of healthy and allergic mothers.

Theoretical part of the bachelor thesis describes the major components of the immune system involved in the development of allergic disease. Development of fetal immune system with special focus on ontogenesis of compound involved in allergic diseases is mentioned as well. In the thesis, immunopathological reaction type I, commonly known as allergy is explained. The last part is devoted to T regulatory cells, their discovery, subpopulations, their role as a potential prognostic marker pointing to increased risk of allergy development, their function during the allergy pathogenesis, potential options of therapeutic usages and the ability of probiotics to promote their functionality.

The practical part describes the investigated material, its preparation for measurement and analysis by flow cytometry.

Results demonstrated that T regulatory cells in cord blood of newborns of healthy and allergic mothers have different characteristics. A significant difference was found in the median of fluorescence intensity of FoxP3 and in the number of induced T regulatory cells, both factors were lower in cord blood of children of allergic mothers indicating impaired function of T regulatory cells and more pronounced immaturity of immune system of newborns of allergic mothers.

Keywords

T regulatory cells; immune system; allergy; IgE; cord blood; flow cytometry

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav	10
2.1	Imunitní systém	10
2.1.1	Nespecifická imunita	10
2.1.2	Specifická imunita	14
2.2	Imunitní systém plodu.....	18
2.2.1	Vývoj fetálního imunitního systému	19
2.2.2	Ontogeneze složek imunitního systému hrajících roli při alergickém onemocnění.....	20
2.3	Alergie	22
2.3.1	Imunopatologická reakce I. typu	24
2.4	T regulační buňky	25
2.4.1	Přirozené T regulační buňky	27
2.4.2	Indukované T regulační buňky	28
2.4.3	T regulační buňky jako prognostický znak poukazující na zvýšené riziko vzniku alergických onemocnění.....	31
2.4.4	T regulační buňky a jejich role při alergii a její léčbě	31
2.4.5	Imunomodulační vlastnosti probiotik a jejich schopnosti zvyšovat počet či funkční vlastností T regulačních buněk	33
3	Cíl práce.....	35
4	Metodika	36
4.1	Materiál	36
4.2	Reagencie	36
4.3	Pomůcky	37

4.4	Přístroje	37
4.4.1	Box s laminárním prouděním.....	37
4.4.2	Vortex	38
4.4.3	Centrifuga.....	39
4.4.4	Průtokový cytometr	39
4.5	Příprava vzorku	40
4.5.1	Barvení povrchových antigenů	40
4.5.2	Barvení intracelulárních antigenů	41
4.6	Použité metody	42
4.6.1	Centrifugace	42
4.6.2	Průtoková cytometrie	42
5	Výsledky.....	44
5.1	Ukázka strategie gatování.....	44
5.2	Vyhodnocení dat z průtokové cytometrie.....	47
6	Diskuze	51
7	Závěr	57
8	Seznam použitých zkratk.....	58
9	Seznam použité literatury.....	62
10	Seznam použitých obrázků	74
11	Seznamu použitých tabulek	75

1 ÚVOD

Alergie je přehnaná reakce imunitního systému na neškodné látky vyskytující se běžně kolem nás. Na rozvoji vzniku alergie a jejích klinických projevů se podílejí humorální i buněčné složky imunitního systému, jejichž vývoj začíná záhy po oplození a ovlivňuje ho řada endogenních a exogenních faktorů. Alergická onemocnění patří mezi jedno z nejčastějších onemocnění dnešní doby s čím dál častějším výskytem, proto je důležité odhalit včasný prognostický znak poukazující na zvýšené riziko rozvoje alergie.

Jako prognostický znak poukazující na zvýšené riziko alergického onemocnění by mohly sloužit T regulační buňky (Treg) pupečnickové krve, které mají rozdílné vlastnosti u dětí zdravých matek (děti s relativně nízkým rizikem rozvoje alergie) a u dětí alergických matek (děti s poměrně vysokým rizikem rozvoje alergie). Díky svým imunomodulačním vlastnostem, které ovlivňují funkčnost Treg zvýšením hladiny mediánu intenzity fluorescence FoxP3 u kolonizovaných dětí alergických matek, by mohla probiotika sloužit jako preventivní opatření snižující riziko rozvoje alergií u predisponovaných dětí. Regulační T buňky 1 (Tr1) patří mezi indukované Treg a ve zvýšené míře vznikají při specifické alergenové imunoterapii a produkují protizánětlivý cytokin IL-10 a TGF- β , čímž dochází k útlumu alergické reakce potlačením eozinofilů, efektorových Th1, Th2 a Th17 lymfocytů a degranulaci a potlačení bazofilů a žírných buněk, přeměně protilátky z IgE na IgG4 a potlačení migrace zánětlivých buněk do tkání. Specifická alergenová imunoterapie představuje zatím jedinou klinicky zavedenou léčbu, která vyvolává tvorbu antigenně specifických Treg. Působení vitaminu D3 ovlivňuje naivní CD4 lymfocyty, čímž dojde k tvorbě Treg, produkujících pouze IL-10.

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Imunitní systém

Imunitní systém (IS) patří spolu s humorálním a nervovým systémem k základním homeostatickým mechanismům živého organismu a společně tvoří jeden superinformační systém [1]. Hlavní funkcí imunitního systému je obrana proti vnějším agens, jako jsou například patogenní mikroorganismy a tím udržet integritu vnitřního prostředí organismu. To je umožněno rozpoznáním vlastního od nevlastního a následném vyvolání imunitní odpovědi proti nevlastnímu [2].

Látky, které IS rozpoznává a reaguje na ně, se nazývají antigeny. Nejčastěji se jedná o látky z vnějšího prostředí – exoantigeny, které mohou představovat alergen pro senzitivní jedince [3].

Všechny jaderné buňky organismu mají na svém povrchu MHC glykoproteiny I. třídy (MHC gp I). Pouze antigen prezentující buňky (APC) mají na svém povrchu MHC glykoproteiny II. třídy (MHC gp II). Mezi APC patří dendritické buňky, monocyty, makrofágy a B lymfocyty. Funkcí APC je předkládání cizích peptidových fragmentů proteinů v komplexu MHC gp II molekulami antigenně specifickým T lymfocytům [3].

2.1.1 Nespecifická imunita

Nespecifické imunitní mechanismy, nazývané též neadaptivní či vrozené, jsou evolučně starší a nacházíme je v různé míře u všech mnohobuněčných organismů. Tvoří je buňky a molekuly, které jsou v organismu připraveny předem. Nespecifické složky imunity reagují na škodlivou látku velmi rychle. Nemají imunologickou paměť, tudíž nemohou být ovlivněny předchozím setkáním se škodlivou látkou [3]. Nespecifická imunitní odpověď je velmi důležitá pro

navození specifické imunitní odpovědi, neboť poskytuje signály, které vedou k diferenciaci a proliferaci antigenně specifických B a T lymfocytů [4].

Buněčná část nespecifické imunity je tvořena buňkami myeloidní a v menší míře i lymfoidní linie [1].

Bazofilní granulocyty disponují granuly, které obsahují především histamin a serotonin. Na svém povrchu mají navázané molekuly IgE, na které se váže alergen, tím dochází k degranulaci a vypuštění produktů z granul, mezi které patří produkty kyseliny arachidonové, leukotrieny, prostaglandiny a další [5].

Bazofily se z krevního řečiště do periferie dostávají během zánětlivé reakce a podílejí se na vzniku opožděné fáze alergické reakce. Na svém povrchu exprimují receptory FcεRI. Po opětovné expozici antigenu, dochází po kontaktu bazofilu s plazmatickou buňkou ke zvýšené produkci protilátek typu IgE. Bazofily uvolňují interleukiny (IL) 4 a 6 [6].

Eozinofilní granulocyty se především uplatňují v obraně proti mnohobuněčným parazitům a při pohlcení (fagocytóze) imunokomplexů protilátka-alergen. [3, 5].

Jejich cytotoxické efektorové funkce mají za následek nejen poškození parazita, ale i poškození vlastní tkáně organismu během alergických reakcí. Eozinofily se normálně vyskytují v krevním oběhu a ve sliznicích na rozhraní vnějšího a vnitřního prostředí. Při protiparazitární a alergické odpovědi migrují eozinofily do tkání. Podílejí se na vzniku pozdní fáze alergické reakce. Zvýšenou produkci IL-5 spojenou s převládající Th2 imunitní odpovědi nacházíme u pacientů s alergickým onemocněním či parazitární infekcí [6].

Neutrofilní granulocyty tvoří většinu krví cirkulujících leukocytů a žijí krátce. Uplatňují se především v první linii obrany, a to proti extracelulárním mikrobům a některým plísním, jejich funkcí je fagocytóza antigenů [5].

Žírné buňky neboli též mastocyty vznikají z granulocytových prekurzorů v kostní dřeni a podobají se bazofilům. Ačkoliv patří mezi granulocyty, tak jejich hlavní funkce je sekreční. Mezi jejich funkce patří obrana proti parazitárním infekcím, regulace imunitní odpovědi, komunikace mezi imunitním a nervovým systémem [3].

Receptorem žírných buněk je FcεRI, díky kterému jsou na povrchu vázány molekuly IgE, které dokážou rozeznat antigeny mnohobuněčných parazitů. Po navázání antigenu dochází k degranulaci a vylití obsahu granul ven z buňky, což vede k poškození parazita. Stejný typ reakce je zodpovědný za projevy imunopatologické reakce I. typu, kdy reaguje na neškodné antigeny, například pylová zrna [3].

Monocyty jsou buňky kolující v krevním oběhu, jejich funkcí je fagocytóza a slouží jako prekurzor tkáňových makrofágů [5].

Makrofágy se diferencují z monocytů. Jejich hlavní funkcí je fagocytóza větších částic, zejména zbytků odumřelých buněk a podílejí se i na obraně proti intracelulárním parazitům. Na rozdíl od granulocytů nemohou své efektorové funkce vykonávat ihned, ale až po aktivaci signály vysílané T lymfocyty [3].

Při alergické a protiparazitární odpovědi vznikají makrofágy II. typu. Jejich tvorbu indukují IL-4 a IL-13, které produkují Th2 lymfocyty. Jsou protizánětlivé a podílejí se na reparaci poškozené tkáně [6].

Dendritické buňky (DC) jsou profesionální antigen prezentující buňky, mající řadu receptorů, které zvyšují absorpci antigenu a jsou specializované pro vystavení komplexu fragmentů antigenu s MHC gp II T lymfocytům. Jsou také zodpovědné za aktivaci naivních T lymfocytů a kontrolují jejich funkci [7].

Před tím, než mohou dendritické buňky vykonávat svou hlavní funkci, která je iniciace imunitní odpovědi, musí projít fází migrace a zrání. Většina DC nacházejících se v lidském těle je v nezralé formě a jsou umístěny ve tkáních na rozhraní organismu, například v kůži, kde se nazývají Langerhansovy buňky. Nezralé DC jsou určeny pro pohlcování mikrobů a dalších antigenů. Po setkání s antigenem dochází k její aktivaci a stává se z ní zralá dendritická buňka. Vyzrávající DC se přesouvají do lymfatických orgánů, při tom ztrácejí schopnost pohlcovat částice a mění se na účinné APC. Zde dochází ke kontaktu DC s lymfocyty, které rozpoznávají prezentovaný antigen. Lymfocyty, které rozpoznaly antigen, začnou růst a tvořit produkty, které jsou nutné pro správný průběh imunitní reakce. Dendritické buňky se významným způsobem podílejí na zachování imunitní tolerance vůči tělu vlastním tkáním [3, 8].

Výše popsané dendritické buňky patří mezi myeloidní DC (mDC). Kromě nich jsou známy ještě například plazmacytoidní DC (pDC), které jsou funkčně i morfologicky odlišné [3].

NK buňky (natural killer cells) přirození zabíječi, pocházejí spolu s B a T lymfocyty z lymfoidní linie. Povrchovými znaky NK buněk jsou molekuly CD16 a CD56. Mají schopnost spontánní cytotoxicity. Ve svých granulích disponují perforiny a granzymy [1].

Humorální část nespecifické imunity tvoří především komplementový systém, opsoniny a některé cytokiny [4].

Komplementový systém tvoří nejdůležitější složku nespecifické humorální imunity. Tvoří jej asi 40 sérových a membránových proteinů a glykoproteinů (v některých literaturách se uvádí cca 30 proteinů) [1].

2.1.2 Specifická imunita

Antigenně specifické imunitní mechanismy, nazývané též adaptivní či získané, jsou evolučně mladší a nacházíme je až u obratlovců [3]. Tyto mechanismy reagují a rozvíjí se až po vniknutí antigenu do organismu, plně aktivní se stávají během několika dní až týdnů. Jejich účinek je specifický, zacílený proti konkrétnímu antigenu. Důležitou vlastností antigenně specifické imunity je její imunologická paměť a specifičnost [1, 9]. K prvotnímu kontaktu B i T lymfocytů s antigenem dochází v sekundárních lymfatických orgánech [10].

Buněčnou část specifické imunity tvoří různé subpopulace T lymfocytů pocházejících z lymfoidní linie [3].

Lymfocyty uvolněné z kostní dřeně kolují v krevním oběhu, odkud jsou zachyceny v thymu (brzlíku), kde se působením látek produkovaných thymem mění na T lymfocyty. Vývojem v thymu se stávají buňky imunokompetentní [10].

Na povrchu T lymfocytů se nachází T receptor (TCR). Receptory se na povrchu T lymfocytů nenacházejí samostatně, ale tvoří komplex s molekulou CD3, která slouží jako diferenciační znak. TCR rozeznávají komplexy MHC glykoproteinů s peptidovými fragmenty antigenu [1, 3].

Cytotoxické T lymfocyty (Tc) nesou na svém povrchu CD3 a CD8 znaky. CD8 slouží jako koreceptor pro MHC gp I. Pro zahájení imunitní odpovědi je nutné, aby Tc rozeznaly komplexy MHC gp I s antigenními peptidovými fragmenty prezentovanými na povrchu antigen prezentujících buněk. Po rozpoznání antigenu prekurzorem začíná diferenciace a proliferace prekurzoru na klon zralých efektorových Tc buněk. Zralé Tc putují krevním oběhem do tkání, kde začínají působit [3].

Pomocné T lymfocyty (Th) nesou na svém povrchu CD3 a CD4 znaky. Podle produkovaných cytokinů se dělí především na Th1 a Th2. Obě linie mají vzájemný antagonistický účinek a každá má v imunitní reakci jinou funkci. CD4 znaky slouží jako koreceptory pro MHC gp II [3, 11].

Th1 navozují a regulují buněčnou imunitní reakci. Imunitní odpověď založená na téhle subpopulaci je reakcí zánětlivou. IFN- γ aktivují makrofágy, tudíž může dojít ke zničení intracelulárního parazita uvnitř makrofágů. IL-2 je využíván samotnými Th1 buňkami jako růstový faktor. Vzájemné působení makrofágů a Th1 lymfocytů je podstatou imunopatologické reakce opožděného typu (DTH) [3].

Th2 jsou buňky pomocné, které se diferencují z naivních T lymfocytů po předložení zpracovaného antigenu APC buňkami ve vazbě s MHC gp II. Ty pak dále pomáhají aktivaci a diferenciaci B lymfocytů do plazmatických buněk. Působením IL-4 na plazmatické buňky dochází k izotopovému přesmyku, což vede k produkci protilátek třídy IgE a IgG4. Th2 vznikají pod působením IL-4 a samy jsou jeho důležitým zdrojem. Dále Th2 lymfocyty produkují například cytokiny IL-5, IL-6 a IL-13, které také pomáhají stimulovat imunitní odpověď směrem k humorální a stimulují produkci IgE. IL-5 působí jako růstový faktor eozinofilů, stimuluje jejich proliferaci a diferenciaci v kostní dřeni. IL-13 má obdobnou funkci jako IL-4, ale nestimuluje vznik Th2 [12].

Jeden z nejdůležitějších imunoregulačních mechanismů je založen na podpoře růstu jedné subpopulace pomocných T lymfocytů a na inhibici růstu druhé subpopulace. O tom, jakým směrem se bude imunitní odpověď vyvíjet, rozhoduje poměr cytokinů IL-4 a IL-12. IL-12 produkovaný makrofágy a dendritickými buňkami, které podporují vznik Th1 a IL-4 tvořený bazofily a mastocyty, jenž podporují vznik Th2 [3].

Th17 produkují zejména interleukin 17, což je prozánětlivý cytokin ovlivňující neutrofile a makrofágy. V menší míře tvoří IL-21, který ovlivňuje aktivitu NK buněk a IL-22, který má inhibiční efekt na tvorbu IL-4 Th2 lymfocyty. Předpokládá se, že Th17 hrají roli v některých autoimunitních onemocněních [13]. Th17 a jimi produkováný IL-17 může hrát roli při vzniku různých alergických onemocnění. Alergické astma je chronické zánětlivé onemocnění dolních cest dýchacích, respektive plic. Množství IL-17 bylo zvýšeno v plicích, sputum, bronchoalveolární laváži (BAL) a séru astmatických pacientů. Hladiny IL-17 korelují se stupněm závažnosti přecitlivělosti dýchacích cest u astmatiků, z čehož vyplývá přispění IL-17 k patogenezi astmatu. Také byla prokázána zvýšená hladina IL-17 v nosní tekutině u pacientů s alergickou rhinitidou (rýmou) [14].

ILC (innate lymphoid cells) jsou přirozené lymfoidní buňky. ILCs se diferenciuji ze společného lymfoidního prekurzoru (CLP) ze kterého vznikají všechny známé lymfocyty, u plodu se vyvíjí ve fetálních játrech, u dospělého jedince vznikají v kostní dřeni. ILCs postrádají specifický antigenní receptor, přesto mohou produkovat řadu cytokinů, které odpovídají cytokinům pomocných T lymfocytů. Mezi jejich funkce patří tvorba lymfoidní tkáně, oprava poškozené tkáně, udržování tkáňové homeostázy a obrana proti patogenním mikroorganismům [15].

ILC1 se funkčně podobají Th1 lymfocytům, produkují IFN- γ a vznikají pod působením stejného transkripčního faktoru T-bet. Mezi ILC1 patří i NK buňky [16].

ILC3 jsou typické produkcí IL-17 a IL-22. Stejně jako Th17 jsou závislé na transkripčním faktoru ROR γ t [16].

ILC2 mají podobné funkce jako Th2 lymfocyty, neboť produkují vysoké množství stejných cytokinů, zejména IL-5 a IL-13. Nacházejí se v kůži, dýchacím a gastrointestinálním traktu. Mezi jejich funkce patří podílení se na vypuzení

parazita a produkce IL-5 a IL-13, což vede k uspořádání vhodných podmínek pro potencionální působení ILC2 u alergických onemocnění [17].

Po opakované expozici nízkých dávek alergenu, vedou interleukiny produkované ILC2 k degranulaci eozinofilů a mastocytů, hyperplázii pohárkových buněk, produkci hlenu, kontrakci hladkého svalstva a zvýšení koncentrace protilátek IgE v séru [18]. Studie prokázala, že se ILC2 uplatňují v počáteční fázi alergické reakce v plicích (alergické astma), kde jsou spolu s T lymfocyty hlavními producenty IL-13 [19]. Podílejí se na udržování slizniční homeostázy plic a jsou důležité pro zachování celistvosti epitelu dýchacích cest [15].

T regulační buňky (Treg) představují heterogenní populaci a dají se charakterizovat kombinací povrchových znaků CD4 CD25 a intracelulárního transkripčního faktoru FoxP3. Jsou to buňky regulační tlumící imunitní reakce. Produkují například IL-10, IL-35 a TGF- β [20]. Více viz podkapitola T regulační buňky.

Humorální část specifické imunity tvoří B lymfocyty, pocházející z lymfoidní linie, jejichž vývoj probíhá v kostní dřeni [21].

K prvotnímu kontaktu naivního B lymfocytu s antigenem dochází v sekundárních lymfatických orgánech. Po setkání se z části B lymfocytů diferencují plazmatické buňky produkující protilátky a z části vznikají paměťové B lymfocyty [10].

Na povrchu B lymfocytů se nachází povrchové imunoglobuliny, nejčastěji IgM a IgD (BCR). BCR rozeznává antigen jako takový v nativní formě. Pokud buňka přijme signály, dochází k dělení, diferenciaci na plazmatickou buňku a sekreci velkého množství protilátek. Rozlišujeme pět typů imunoglobulinů [3].

IgM je pentamer kolující v krevním oběhu a je přítomen na B lymfocytech. Protilátky třídy *IgM* se tvoří jako první po kontaktu s určitým antigenem, zajišťují primární odpověď. Mimo jiné jsou nejúčinnějšími aktivátory komplementu [1].

IgG je monomer a v séru je v nejvyšší koncentraci. Tvoří se zejména při opakovaném kontaktu s rozpustným antigenem. Jako jediný dokáže procházet placentou a pomáhá aktivovat komplement [13].

IgA tvoří dvě formy, především slizniční vyskytující se jako dimer chrání slizniční povrchy před mikroorganismy a malá část pak koluje krví jako monomer, dimer či trimer. *IgA* je sekretováno do mateřského mléka [3].

IgE je monomer a v séru zdravých lidí se vyskytuje jen v nepatrném množství. Uplatňuje se na sliznicích při obraně před mnohobuněčnými parazity a je hlavní příčinou alergických reakcí. Díky němu dochází k degranulaci žírných buněk a bazofilů [3]. Více viz podkapitola Alergie.

IgD se nachází v séru jako monomer přítomný na povrchu B lymfocytů. Slouží jako antigenní receptor [13].

2.2 Imunitní systém plodu

Více než 1600 genů se podílí na přirozených a adaptivních imunitních reakcích. Tyhle geny mají velký význam pro udržení/posílení života v nepřátelském prostředí. Přesto se rodíme s relativně nezralým imunitním systémem, který se vyvíjí během celého života [22].

Pro správný průběh nitroděložního vývoje je nutná tolerance plodu matkou a aby si plod udržel imunitní toleranci vůči matčiným aloantigenům (antigen jiného jedince stejného druhu). Kromě posunu k Th2 odpovědi, přispívá k udržení tolerance fetálního imunitního systému vůči matce tvorba T regulačních buněk

plodem. Treg pomáhají potlačit imunitní odpověď vůči matčinyím aloantigenům. Značný počet mateřských buněk procházejících placentou sídlí ve fetálních lymfatických uzlinách a indukují vývoj CD4 CD25 FoxP3 Treg, které potlačují imunitu u plodu a přetrvávají alespoň do časně dospělosti [23].

Na vývoj imunitního systému má vliv řada faktorů. Nespecifická imunita je ovlivněna endogenními faktory, zejména genetickou predispozicí. Specifická imunita se vyvíjí převážně působením exogenních faktorů, mezi něž patří působení mikroorganismů, kolonizace střeva fyziologickou mikrobiotou, vliv výživy *in utero* a aktivní imunizace [24].

Stoupající frekvence výskytu alergií u těhotných žen také ovlivňuje riziko výskytu zánětlivého onemocnění u potomků [25].

Po porodu dochází k náhlému vystavení obrovskému množství environmentálních antigenů, přičemž většina z nich pochází ze střevní komenzální mikrobioty, což vyvolává rychlou změnu stávajících imunitních odpovědí na odpovědi vhodnější pro raný život [22].

2.2.1 Vývoj fetálního imunitního systému

Vývoj fetálního imunitního systému začíná záhy po oplození. Už v "embryonálních tělíscích" třídní blastocysty lidského zárodku je možné prokázat progenitory hematopoetické a lymfopoetické kmenové buňky. Mezi 3. až 4. týdnem těhotenství mohou být detekovány ve žloutkovém vaku pluripotentní progenitory krevních buněk. Tyhle primitivní buňky se u embrya vyskytují ve vznikajících cévách žloutkového vaku, fetálních játrech a v základech thymu, prvním výlučně lymfoidním orgánu. Játra se během 5. až 6. týdne stávají hlavním místem krvetvorby. Ve druhém měsíci se začíná formovat slezina, kde v menší míře také dochází ke krvetvorbě a koncem prvního trimestru se stává převážně lymfoidním orgánem. Krátce nato probíhá lymfopoéza i v lymfatických

uzlinách. Kolem 11. týdne jsou kmenové buňky detekovatelné v kostní dřeni. Jaterní krvevorbba klesá ve 3. trimestru a brzy po narození vymizí úplně. Ve 4. a 5. měsíci těhotenství vznikají základy slizniční lymfatické tkáně (MALT) a Peyerových plátů [26, 27].

2.2.2 Ontogeneze složek imunitního systému hrajících roli při alergickém onemocnění

Vývoj makrofágů a dendritických buněk začíná asi 3. týden těhotenství ve žloutkovém vaku, prekurzory makrofágů nalézáme mezi 6. až 12. týdnem v mezenchymu a v 9. týdnu v kůži, což je velmi zajímavé, neboť vznikají ještě před nástupem krvevorbby v kostní dřeni. Funkce fetálních makrofágů ještě není zcela objasněna, nicméně vzhledem k jejich brzkému výskytu v embryonální tkáni a důležitosti při udržení homeostázy u dospělých jedinců, se uvažuje o jejich zásadní roli při vývoji tkáně a udržení homeostázy [28].

Fetální dendritické buňky se také vyvíjí v brzké fázi prenatálního života a jako zřetelná populace mohou být rozpoznány 9. týden těhotenství v kůži plodu. Vzhledem k nadbytku fetálních DC a jejich zásadní úloze ve sladění imunitní odpovědi v dospělosti, musí mít i fetální DC zásadní význam pro zajištění odpovídající imunitní odpovědi na mateřské a vlastní antigeny v průběhu těhotenství. Fetální DC hrají důležitou roli při podpoře proliferace T regulačních buněk [28].

Kromě toho je pravděpodobné, že neonatální DC produkující IL-12 a monocyty mohou přispívat k tvorbě Th1 lymfocytů. Rodina cytokinů produkovaných IL-12 společně se stupněm zralosti DC a poměrem mDC/pDC mohou zabránit či podpořit rozvoj alergie. Ačkoliv IL-35 také patří do rodiny IL-12 má supresivní účinek na T lymfocyty a je známo, že Treg ho i produkují [29].

T lymfocyty se začínají diferencovat kolem 7. až 9. týdne těhotenství, když první vlna T buněčných progenitorů z fetálních jater začíná osidlovat základy thymu [30].

Imunitní systém vyvíjejícího se lidského plodu je vhodným prostředím pro utváření periferní tolerance. Fetální T buňky, které jsou odvozeny z hematopoetické linie, hrají významnou roli při tomto tolerogenním uspořádání, protože jsou relativně obohaceny o Treg a kromě toho mají fetální CD4 lymfocyty silné predispozice k diferenciaci do Treg po stimulaci antigenem, které podporují autotoleranci i toleranci k nedědičným antigenům na chimérních matčiných buňkách, nacházejících se ve většině tkání plodu. Stejně tolerantně jako na matčiny aloantigeny by měl fetální imunitní systém reagovat na antigeny nacházející se v děloze, včetně autoantigenů, potravinových antigenů a infekčních antigenů přenesených z matky placentou [31].

Jak se začíná blížit termín porodu, musí dojít k zásadnímu přechodu z fetální tolerogenní imunitní odpovědi na obranné mechanismy dospělého imunitního systému, kterým dominují T lymfocyty, které jsou schopné podporovat reakce proti patogenům [31].

B lymfocyty mohou být detekovány již v 8. týdnu těhotenství v játrech a omentu jako Pro-B (CD24+/povrchové IgM-) a Pre-B (cytoplazmatické IgM+/povrchové IgM-). B buňky jsou dále detekovatelné ve slezině během 13. až 23. týdne a v peritoneální a pleurální dutině v 15. týdnu těhotenství [26].

Podíl nezralých buněk klesá spolu s rostoucím věkem plodu. B lymfocyty začínají cirkulovat krví 12. týden těhotenství. Procento CD5 B lymfocytů kolujících fetální krví, je daleko vyšší než u dospělého člověka. S délkou těhotenství toto procento sice klesá, ale i při narození je většina B lymfocytů z pupečnickové krve CD5 [26].

Produkce imunoglobulinů nastává ve slezině již 10. týden tvorbou protilátek typu IgM, ve 12. týdnu následuje tvorba IgG [32]. Maximální hodnoty produkce protilátek jsou kolem 17. až 18. týdne. Fetální IgG může být detekován v krevním oběhu plodu již 17. týden těhotenství, i když většina IgG pochází od matky, neboť v průběhu těhotenství dochází k přenosu IgG skrz placentu. Počátek syntézy IgE byl pozorován v 11. týdnu ve fetálních játrech a plicích a v 21. týdnů ve slezině [26].

Navzdory brzkému počátku tvorby imunoglobulinů plodem, mají novorozenci velmi nízkou koncentraci sérového IgM a dokonce ještě nižší hladiny IgA. Hladiny IgE jsou téměř nulové a v podstatě veškerý IgG je maternálního původu. Velmi nízká produkce IgE během těhotenství není způsobena nevyzrálostí B lymfocytů, ale nízkou produkcí IL-4 fetálními buňkami. Navíc izotypový přesmyk na IgE u plodu vyžaduje přítomnost vyšších hodnot IL-4, než jak je tomu u dospělých [26].

2.3 Alergie

Alergie lze definovat jako přehnanou imunitní odpověď organismu na zcela běžný exoantigen neboli též alergen. Exoantigeny jsou běžné látky z prostředí, na které imunitní systém nealergického jedince nereaguje a toleruje je. U vnímavého jedince dochází ke vzniku neadekvátní imunitní odpovědi. Alergická imunitní odpověď je mediována protilátkami třídy IgE [33].

Protilátky třídy IgE se fyziologicky uplatňují v první obranné linii proti mnohobuněčným parazitům, jako jsou červi, ale mohou také zprostředkovávat nepatřičnou imunitní odezvu na neškodné antigeny prostředí prostřednictvím reakce nazývané časná přecitlivělost I. typu, která může přispět k patogenezi alergických onemocnění, například u astmatu, alergické rýmy či atopické dermatitidy. Ze všech imunoglobulinů se IgE vyskytuje v séru v nejnižší

koncentraci. IgE může vznikat dvěma způsoby. Přímo cestou z IgM na izotyp IgE, anebo postupným izotopovým přesmykem z IgM na IgG1 a poté na IgE [34].

Alergie je jedním z nejčastějších zdravotních problémů se stále se zvyšujícím výskytem. Jedna z teorií vysvětluje tento ohromný nárůst alergií pomocí hygienické hypotézy, která předpokládá vliv nižší přítomnosti mikrobů obzvláště ve vyspělých zemích, vedoucí k pozměnění vývoje imunitního systému, tudíž podporuje rozvoj alergie u predisponovaných dětí. Pro úspěšný průběh těhotenství je nezbytně nutná podpora a upřednostnění Th2 imunitní odpovědi viz výše [35].

Ustanovení nové imunologické rovnováhy pokračuje postnatálně po setkání s vnějším prostředím. Opožděné vyžívání novorozeneckého imunitního systému spolu s přetrvávající převahou Th2 imunitní odpovědi může přispívat k rozvoji alergického onemocnění. Th1 a Th17 odpovědi jsou důležité pro protiinfekční obranu, nicméně se mohou uplatňovat při rozvoji autoimunitních onemocnění. Tudíž je nutná velmi jemná regulace jednotlivých typů odpovědí, zejména nastolení rovnováhy mezi Th1/Th2 odpovědí a T regulačními buňkami, což pomáhá předcházet atypické imunitní odpovědi po narození. Regulační T buňky hrají nezastupitelné místo v tomto doladování a omezují patologické reakce, včetně odpovědi Th2 s alergií spojené [35].

Účinný imunitní vývoj v raném věku je důležitý pro prevenci chronických zánětlivých onemocnění, jako je alergie a astma. Z pohledu genetiky lze atopie klasifikovat jako genetickou predispozici k rozvoji onemocnění, podmíněnou multifaktoriální dědičností. Predispozici k rozvoji onemocnění zajišťuje více genů a komplexní změny v interakcích mezi těmito geny a vnějším prostředím jsou zodpovědné za vývoj choroby a její klinické projevy. Faktory prostředí modulují genovou expresi epigenetickými mechanizmy [6, 36].

2.3.1 Imunopatologická reakce I. typu

Imunopatologická reakce I. typu (IP I), neboli též časná přecitlivělost je reakcí humorální, založená na tvorbě protilátek třídy IgE a patří mezi nejčastější imunopatologické poruchy, postihující více než 30 % evropské populace. Reakce IP I se běžně označuje jako alergie. Vyznačuje se rychlým nástupem po expozici alergenu a výraznými klinickými projevy objevující se během pár minut [37].

Při imunopatologické reakci I. typu dochází k proliferaci B lymfocytů na plazmatické buňky za pomoci Th2 lymfocytů. Během prvního setkání organismu s alergenem dochází ke stimulaci B lymfocytů, které začínají produkovat protilátky izotypu IgE specifické k alergenům [38].

Při senzibilizaci alergenem se protilátky třídy IgE váží na vysoce specifické FcεRI receptory bazofilů a žírných buněk [39].

Pozdější expozice stejného alergenu vede k přemostění vázaných molekul IgE na citlivých buňkách, což vede k degranulaci a sekreci aktivních mediátorů například histaminu, serotoninu, prostaglandinů či leukotrienů (ty jsou syntetizovány jako produkty metabolismu kyseliny arachidonové). Uvolnění mediátorů má za následek vaskulární permeabilitu, vazodilataci, kontrakci hladkého svalstva v okolní tkáni a tvorbu hlenu [12, 40].

Odpověď imunitního systému na alergen se dělí na časnou a pozdní fázi alergické reakce. Bezprostřední, časná reakce organismu na alergen se uskuteční v rámci několika minut a je závislá na vylití mediátorů z granul žírných buněk a krevních bazofilů. Po uvolnění mediátorů se objevují příznaky charakteristické pro postižený orgán, například po vdechnutí alergenu je to kýčání a smrkání, po požití alergenu se objevují průjemy a zvracení, po vniknutí alergenu do kůže se objevuje kopřivka a svědění. Mezi velmi závažné projevy alergie se považuje rozvoj anafylaktického šoku, který dokáže vyvolat kožní i potravinový alergen.

Na časnou fázi obvykle navazuje fáze pozdní, která je spojená s nahromaděním zánětlivých T lymfocytů, neutrofilů, eozinofilů a bazofilů ve tkáních, objevující se až několik hodin po expozici alergenu. Pozdní fáze alergické reakce může přejít až do chronického zánětu [12, 39, 41].

2.4 T regulační buňky

V 70. letech 20. století učinili Gershon a Kondo klíčový objev, že T lymfocyty nejenom podporují, ale i tlumí průběh imunitní reakce. Zjistili, že za touto regulací imunitní odpovědi stojí subpopulace T lymfocytů odlišná od pomocných T lymfocytů. Předpokládalo se, že by se mohlo jednat o subpopulaci CD8 lymfocytů. Tlumivé T lymfocyty získaly označení jako supresorové [42, 43].

Pojem supresorové T buňky měl na výzkumy na poli imunologie a klinické medicíny veliký dopad. Začaly se objevovat názory, že za alergické a autoimunitní onemocnění může nedostatek supresorových T buněk, oproti tomu na druhé straně, že za imunodeficienci může naopak přemíra supresorových T buněk [44].

Nicméně v roce 1988 byla existence supresorových T buněk zpochybněna, a to zejména díky tomu, že doposud nebyl prokázán jejich jednotný znak [44].

Teprve v polovině 90. let 20. století byla u CD4 buněk objevena subpopulace exprimující α řetězec pro receptor IL-2, nesoucí označení CD25. Buňky s povrchovými znaky CD4 a CD25 se podílejí na udržení autotolerance v periférii a periferních tkáních [45].

Aby se vyhnulo předchozím nesrovnalostem po zpochybnění jejich existence, dostaly T supresorové buňky název T regulační buňky [46].

Téměř 10 % CD4 T lymfocytů a necelé 1 % CD8 T lymfocytů periferní krve ve zdravých dospělých myších exprimuje molekulu CD25. Pokusem na dospělých

myších bylo prokázáno, že odebrání subpopulace CD4 CD25 T regulačních buněk (které u myší a lidí tvoří 5-10 % populace CD4), vede k rozvoji různých autoimunitních onemocnění zesílením imunitní reakce proti exoantigenům a vyvoláním autoimunitní reakce proti autoantigenům [45]. Eliminace Treg také spouští nepřiměřené, anebo špatně mířené imunitní reakce na bakteriální antigeny, což může mít za následek různé imunopatologie, například nespecifické střevní záněty. Ty mohou vznikat v důsledku nepřiměřené reakce T lymfocytů na fyziologickou střevní mikrobiotu [47].

V roce 2001 byl identifikován gen *foxp3*. V roce 2003 byla prokázána jeho funkce ve vývoji a proliferaci T regulačních buněk [43]. Jedná se o gen, který kontroluje produkci proteinu forkhead box P3 (FoxP3). FoxP3 protein se naváže na specifická místa v molekule DNA a pomáhá kontrolovat aktivitu genů, které se podílejí na regulaci imunitního systému. FoxP3 je nezbytný pro vznik a správnou funkci T regulačních buněk [48].

Transkripční faktor FoxP3 je lokalizován na chromozomu X a ztráta jeho funkce vede k závažným multiorgánovým autoimunitám a autoimunitnímu polyendokrinnímu syndromu vázanému na chromozom X (IPEX). Mutace ve FoxP3 narušují diferenciaci a funkci CD25 T regulačních buněk [49].

Funkce T regulačních buněk spočívá v tom, že mají nezastupitelnou roli při udržování imunologické tolerance vůči autoantigenům (nereagují na ně) a potlačují nepřiměřenou imunitní odpověď, která by vedla k poškození organismu. Také pomáhají udržovat stálost vnitřního prostředí organismu [50]. Porucha imunologické tolerance vede k autoimunitním onemocněním, například k diabetes mellitus I. typu [51].

Jsou známy dvě hlavní subpopulace Treg. Přirozené T regulační buňky, které vznikají v thymu a indukované T regulační buňky, které vznikají v periferních

tkáních. Indukované Treg se především dělí na linie regulačních T lymfocytů 1 (Tr1) a pomocných T lymfocytů typu 3 (Th3) [50].

Mezi fenotypové znaky Treg patří CD4 CD25 a FoxP3. Identifikace na základě CD25 je problematická, neboť CD25 je exprimován i na aktivovaných T lymfocytech. Nejvíce specifickým znakem je v současnosti transkripční faktor FoxP3. V menší míře je exprimován i GITR (glukokortikoid-induced tumor necrosis factor receptor), který hraje důležitou roli v diferenciaci přirozených Treg a v jejich expanzi spolu s indukovanými Treg. Znakem přirozených Treg je transkripční faktor Helios, který se váže na FoxP3 [52].

2.4.1 Přirozené T regulační buňky

T regulační buňky jsou považovány za klíčové v periferní toleranci. Jsou schopny potlačit T lymfocyty a účinně zabraňují autoimunitám. Jelikož se přirozené T regulační buňky (nTreg) vyvíjejí v thymu, musí projít stejnými vývojovými kroky a selekcí jako ostatní T lymfocyty [53]. Během vývoje T lymfocytů v thymu exprimují nezralé thymocyty různou škálu $\alpha\beta$ -TCR, což je klíčový faktor pro diferenciaci a aktivaci T lymfocytů určitým směrem [54]. Vývoj nTreg probíhá v thymu z prekursorů FoxP3-, CD4+, CD8- thymocytů [55].

Produkují IL-10 a TGF- β a představují největší podmnnožinu Treg. nTreg odpovídají na autoantigeny. Aby mohly vykonávat svoji supresivní funkci, musí dojít ke kontaktu nTreg s T lymfocytem a tím dojde k zástavě jeho proliferace. Mezi jejich funkce patří inhibice Th1, Th2 i Th17 odpovědi, eliminace tvorby antigenně specifických IgE a zároveň indukují sekreci IgG4. Potlačují bazofily, eozinofily, žírné buňky a účastní se tkáňové remodelace [56].

Vzhledem k tomu, že molekulu CD25 mohou exprimovat všechny T lymfocyty, nelze ji použít jako identifikační marker nTreg. Pouze 2-4 % buněk produkujících nejvyšší hladiny CD25 patří mezi nTreg. Proto se nTreg označují jako CD25^{high} [57].

Mimo vysokou expresi CD25 se Treg vyznačují oproti jiným T lymfocytům nízkou expresí α řetězce receptoru pro IL-7 nesoucí označení CD127, proto se označují CD127^{low} [58]. Důležitým znakem na rozlišení přirozených Treg od indukovaných Treg je transkripční faktor Helios – z rodiny Ikaros. Protein Helios exprimují přirozené T regulační buňky [59].

Mezi další identifikační znaky nTreg patří například CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4), L-selektin (CD62L) či GITR. Nicméně exprese těchto molekul není omezena pouze na nTreg. Další problém představuje fakt, že je nTreg neumí jednotlivě vystavit na svém povrchu. Teprve identifikace transkripčního faktoru FoxP3 umožnila lepší identifikaci Treg [57].

Mezi důležité faktory pro vývoj a správnou funkci nTreg patří FoxP3 (uplatňuje se i u indukovaných Treg), zodpovědný za vlastnosti nTreg, TGF- β , který hraje roli v udržení exprese FoxP3 a má významnou funkci pro imunosupresivní účinky a IL-2 důležitý pro udržení periferních nTreg [57].

2.4.2 Indukované T regulační buňky

Indukované Treg (iTreg) vznikají v periferní krvi z naivních CD4 T lymfocytů při imunologicky tolerančním prostředí a během zánětu. Vznik iTreg byl pozorován v případech, kdy dochází k rozpoznání antigenů T buněčnými receptory CD4 T lymfocytů bez patřičné kostimulace, kdy byl antigen T lymfocytům prezentován nezralou APC, například neúplně aktivovanou dendritickou buňkou [60].

V přítomnosti TGF- β a IL-2 může dojít k rozvoji silných supresivních účinků. Působením TGF- β dochází ke změně fenotypu CD4 buněk na CD4 CD25, který je podobný fenotypu u nTreg, dále TGF- β indukuje aktivaci transkripčního faktoru FoxP3, který je zodpovědný za generování T regulačních buněk. Samotné působení TGF- β není postačující, neboť u CTLA-4 deficientních myši k tvorbě iTreg nedošlo.

Transkripční faktor CTLA-4 má tudíž pro vývoj iTreg zcela nepostradatelnou roli [61].

Je zajímavé, že stimulace TGF- β v přítomnosti IL-6 umožňuje diferenciaci T buněk na Th17 lymfocyty u lidí i myši. Naproti tomu IL-2 umožňuje diferenciaci naivních CD4 T lymfocytů ve FoxP3 Treg, ale inhibuje jejich diferenciaci do Th17 buněk [50].

Regulační T buňky 1 (Tr1) vznikají z naivních T lymfocytů stimulací antigenem v přítomnosti IL-10. Klíčovou roli v tomto procesu hrají nezralé dendritické buňky produkující IL-10 [62]. IL-27 byl identifikován jako diferenciační faktor vyvolávající tvorbu IL-10, díky čemuž je diferenciace Tr1 zesílena. IL-27 je exprimován dendritickými buňkami [63]. Tr1 produkují vysoké hladiny IL-10, TGF- β a IL-5 a zároveň produkují nízké hladiny IFN- γ a IL-2. Důležitý je fakt, že oproti přirozeně se vyskytujícím Treg konstitutivně neexprimují transkripční faktor FoxP3 [56, 62].

Regulace imunitní odpovědi Tr1 buňkami spočívá v jejich sekreci imunosupresivních cytokinů IL-10 a TGF- β , čímž dochází k supresi migrace a funkce naivních i paměťových T lymfocytů a k supresi bazofilů, eozinofilů a žírných buněk [56, 62].

Tr1 buňky jsou také důležité v potlačení imunitní odpovědi proti alergenům. Antigen specifické Tr1 buňky jsou důležité pro udržení tolerance u zdravých jedinců a nerovnováha mezi alergenně specifickými Tr1 buňkami a Th2 buňkami může být hlavním faktorem v rozvoji alergie [56, 62].

Tr1 buňky se uplatňují v mechanismu specifické alergenové imunoterapie, což je léčba, při níž se alergickému pacientovi nejčastěji injekčně podávají postupně zvyšující se dávky alergenu, který jeho imunitní systém rozpoznává a reaguje na něj imunopatologickou reakcí. V prvotní fázi dochází k desenzibilizaci pacienta

(fáze úvodní), pozdější vyšší dávky slouží k udržení imunologické tolerance (fáze udržovací), udržovací dávky se podávají opakovaně. Hlavním cílem specifické alergenové imunoterapie je snížit příznaky, které vyvolá daný alergen a zabránit opakování onemocnění v dlouhodobém horizontu [64, 65].

Imunologické změny, ke kterým dochází během specifické alergenové imunoterapie nejsou zcela objasněny. Úspěšná imunoterapie byla spojena s posunem od Th2 imunitní odpovědi, která podporuje rozvoj alergických onemocnění, k imunitní odpovědi Th1 vlivem IL-12. To je také spojené s tvorbou T regulačních buněk, které produkují protizánětlivý cytokin, IL-10 a TGF- β . Působením IL-10 dochází ke snížení hladiny IgE a zvýšení hladiny IgG4. Dále dochází ke snížené produkci a uvolňování mediátorů, například histaminu z bazofilů a žírných buněk. Alergický zánět není tak intenzivní a poškození tkání bývá omezeno [64, 65].

Pomocné T lymfocyty typu 3 (Th3) byly objeveny při zkoumání mechanismů souvisejících s orální tolerancí na sliznicích. Navození tvorby Th3 je umocněno působením TGF- β a IL-4 [66].

Th3 primárně produkují TGF- β , který poskytuje podporu protilátek izotypu IgA a potlačuje imunitní odpovědi Th1 i Th2. Kromě vysokých hladin TGF- β produkují v různé míře IL-4 a IL-10 [66].

TGF- β je klíčová regulační molekula, která udržuje homeostázu imunitního systému a Th3 regulační buňky jsou jedním z hlavních mechanismů, kterými je tato homeostáza udržována [66].

iTR 35 cells je subpopulace Treg, kterou získáme při léčbě pacientových naivních T lymfocytů cytokinem IL-35. Takto vzniklé regulační buňky nazýváme iTR 35 a neexprimují transkripční faktor FoxP3, jsou velmi supresivní a stabilní. iTR 35 vzniklé *ex vivo* mohou mít terapeutický účinek [67].

2.4.3 T regulační buňky jako prognostický znak poukazující na zvýšené riziko vzniku alergických onemocnění

Hrdý a kol. při zkoumání Treg v pupečnickové krvi u dětí alergických matek prokázal zvýšený počet celkových CD4⁺ CD25⁺ Treg a zároveň prokázal jejich sníženou funkčnost díky nižší intenzitě fluorescence FoxP3 a snížené sekreci cytokinů IL-10 a TGF- β oproti dětem zdravých matek. Snížené imunologické funkce Treg u predisponovaných dětí mohou signalizovat sníženou schopnost potlačení abnormální imunitní reakce na alergeny v budoucnu. Je tedy možné předpokládat, že změny imunitní regulace na alergii náchylného kojence předchází klinickým příznakům alergie [35].

Smith porovnáním Treg v pupečnickové krvi zdravých dětí a dětí, u kterých se v průběhu prvního roku života rozvinula alergie na vejce, poukázala na to, že rozvoj alergie může být spojen se sníženou funkcí CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} a s méně významnou supresí IFN- γ T regulačními buňkami u alergických jedinců. Rozdíl v počtu Treg a mediánu fluorescenční intenzity FoxP3 v této studii nebyl prokázán [68].

Na základě poznatků, které přinesly výše popsané studie, by mohla být snížená funkčnost Treg v pupečnickové krvi považována za prognostický znak poukazující na zvýšené riziko rozvoje alergických onemocnění [35, 68].

2.4.4 T regulační buňky a jejich role při alergii a její léčbě

Adaptivní imunita je řízena Treg, které potlačují odpověď efektorových T lymfocytů a díky tomu jsou Treg klíčové v počáteční fázi senzibilizace patogeneze alergie. Zdá se, že u fyziologické odpovědi organismu na antigen jsou Treg nepostradatelné pro udržení imunitní tolerance bráněním v indukci Th2 buněk a následném uvolňování Th2 cytokinů (IL-4, IL-5, IL-13). Potlačením tvorby Th2 buněk dochází k prevenci hypersenzitivní imunitní odpovědi a senzibilizaci na alergeny. Deregulace FoxP3 hraje také důležitou roli při alergických

onemocněních. Polymorfismy FoxP3 a poruchy funkce nTreg byly spojeny s rozvojem alergií. U astmatiků se v porovnání se zdravými jedinci našlo v bronchoalveolární laváži menší množství FoxP3 Treg a jejich funkce byla narušena [56, 69].

Eliminací působení Treg zvyšujeme riziko závažnosti klinických projevů alergie u senzitivních jedinců. Tolerance periferních T lymfocytů k alergenům vnějšího prostředí je zcela zásadní pro vyvarování se alergie [56, 69].

T regulační buňky se podílejí na léčbě alergických onemocnění, což pomáhá vysvětlit některé terapeutické mechanismy. Navození tolerance v periferních T lymfocytech pomocí specifické alergenové imunoterapie, představuje klíčový krok pro nepatologický průběh imunitní odpovědi na alergen. Přirozené i indukované Treg typu 1 tlumí průběh alergické reakce prostřednictvím několika mechanismů, včetně potlačení efektorových Th1, Th2 a Th17 buněk, bazofilů, eozinofilů a žírných buněk, přeměně protilátky z IgE na IgG4, potlačení zánětlivých DC a potlačení migrace zánětlivých buněk do tkáně [56, 70].

Pokusy na myších modelech alergie a astmatu bylo zjištěno, že Treg jsou nezbytné pro vytvoření a udržení imunitní tolerance vůči alergenům. Studie odpovědi na alergen u zdravých lidí prokázaly existenci dominantní skupiny Treg specifické pro běžné alergeny prostředí [70].

Pochopení mechanismů zapojených do vzniku a funkčnosti Treg, může vést k novým strategiím na obnovení ztracené imunitní tolerance [71].

Například vzdušné antigeny se mohou z dítěte na matku přenést prostřednictvím mateřského mléka. Kojením vyvolaná tolerance je zprostředkována navozením FoxP3 Treg v závislosti na TGF- β . Matrixové metaloproteázy pocházející z komenzálních bakterií střeva usnadňují přeměnu latentního TGF- β na jeho aktivovanou formu, která podporuje diferenciaci Treg.

Kromě toho dendritické buňky lymfatických uzlin filtrujících lymfu ve střevní sliznici, se ukázaly jako účinné v podpoře tvorby iTreg ve střevě, zprostředkováním TGF- β a syntézou kyseliny retinové. TGF- β i kyselina retinová silně vyvolávají expresi FoxP3 [71].

Deficit receptorů pro vitamín D u myší byl spojen se snížením počtu tolerogenních dendritických buněk a zvýšením tvorby efektorových T lymfocytů. Vitamin D3 může být použit u lidí i myší k ovlivnění naivních CD4 T lymfocytů *in vitro*, čímž dojde k navození tvorby T regulačních buněk, produkujících pouze IL-10, mimoto zůstává zachována jejich silná proliferační schopnost. Několik dalších studií předpokládá, že vitamin D3 ovlivňuje hladinu TGF- β a dokáže působit na T lymfocyty přímo navozením tvorby IL-10 Treg [71, 72].

Tato data naznačují, že sliznice zejména ve střevě má několik mechanismů, které dokáží navodit imunologickou toleranci. Sublingvální a perorální imunoterapie se tudíž stávají důležitými v navození imunitní tolerance pro léčbu inhalačních a potravinových alergií [71, 72].

Specifická alergenová imunoterapie zatím představuje jedinou klinicky zavedenou léčbu, která vyvolává tvorbu antigenně specifických Treg a periferní toleranci, která je schopna u lidí obnovit homeostázu. Aktivní imunitní regulace prostřednictvím alergenně specifických Treg se ukazuje jako potenciální terapeutická možnost k prevenci a léčbě alergických onemocnění. Více viz Tr1 [70].

2.4.5 Imunomodulační vlastnosti probiotik a jejich schopnosti zvyšovat počet či funkční vlastností T regulačních buněk

Fyziologická střevní flóra je důležitý modulátor střevních a jiných imunitních funkcí. Změny střevního mikrobiálního složení byly pozorovány u dětí s alergií a u těch, u kterých se alergie rozvinula později během života. Významné rozdíly

v hladinách cytokinů IL-4, IL-10, IL-13 a IFN- γ byly nalezeny u zdravých a alergických skupin matek a jejich dětí [73].

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které v adekvátním množství poskytují svému hostiteli benefity a jsou schopná stabilizovat střevní mikrobiotu. Mikrobiální kolonizace střeva novorozence hraje roli v brzké ontogenezi, například podporuje vývoj novorozeneckého imunitního systému. Přestože jsou benefity probiotik dobře známy, mechanismus jejich působení nebyl zatím zcela popsán [74].

Hrdý a kol. prokázal, že MFI (medián fluorescenční intenzity) FoxP3 nekolonizovaných dětí alergických matek byl podstatně nižší než u kolonizovaných dětí alergických matek, který byl srovnatelný s MFI FoxP3 nekolonizovaných dětí zdravých matek. Nevýznamné rozdíly v intracelulární přítomnosti IL-10 a TGF- β v Treg byly pozorovány v periferní krvi kolonizovaných dětí alergické matek v porovnání s nekolonizovanými dětmi zdravých a alergických matek [74].

Kolonizace novorozenců českou probiotickou vakcínou Colinfant New Born (obsahující kmen *Escherichia coli* O83:K24:H31) významně snížila výskyt alergie u kolonizovaných dětí. Probiotická kolonizace má na nezralý imunitní systém novorozence pozitivní vliv, neboť zvyšuje funkční vlastnosti T regulačních buněk v periferní krvi kolonizovaných dětí. Významný rozdíl v počtu Treg kolonizovaných dětí alergických matek a nekolonizovaných dětí alergických matek nebyl prokázán [74].

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce byl popis využití T regulačních buněk jako možného prognostického znaku poukazujícího na zvýšené riziko vzniku alergického onemocnění, popis Treg v patogenezi alergického onemocnění a případného využití Treg při léčbě alergického onemocnění. Dále byly popsány imunomodulační vlastnosti probiotik a jejich vliv na počet a funkčnost Treg.

Cílem praktické části bakalářské práce byla analýza a porovnání populace T regulačních buněk v pupečnickové krvi novorozenců zdravých matek (dětí s relativně nízkým rizikem vzniku alergie) a novorozenců alergických matek (dětí s relativně vysokým rizikem vzniku alergie) a jejich detailní charakteristika proporčního zastoupení jednotlivých subpopulací Treg a funkčních vlastností Treg v pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek pomocí průtokové cytometrie.

4 METODIKA

Metodika popisuje materiál, ve kterém se T regulační buňky zkoumají, reagencie, pomůcky, přístroje nutné k přípravě vzorku a vlastnímu měření.

4.1 Materiál

Jako materiál slouží pupečnicková krev novorozence odebraná bezprostředně po porodu z pupeční šňůry. Krev se odebírá do sterilní baňky, kde je jako protisrážlivé činidlo použit heparin.

Pupečnicková krev byla odebrána na základě podepsaného písemného informovaného souhlasu žen rodičů v Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze – Podolí.

4.2 Reagencie

Pro extracelulární a intracelulární barvení antigenů T regulačních buněk byl použit komerční kit firmy EXBIO Diagnostics s názvem TregFlowEx Kit ED 7417.

Reagencie použité při barvení povrchových antigenů:

- CD4 FITC/CD25 PE protilátky;
- promývací pufr (PBS neboli promývací pufr připravíme smícháním: 8.0 g NaCl; 0.2 g KCl; 2.0 g KH_2PO_4 ; 1.42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rozmíchám v 800 ml deionizované vody, je nutné upravit pH na hodnotu 7.4 s HCl, poté se doplní deionizovaná voda, aby byla hladina na 1 l rysce).

Reagencie použité při barvení intracelulárních antigenů:

- Fixační a lyzační roztok (připravený v poměru 1/9 s deionizovanou vodou);
- permeabilizační roztok;
- blokující pufr;
- FoxP3 protilátky;
- Helios protilátky;
- promývací pufr (PBS);
- PBS s 1 % formaldehydu.

4.3 Pomůcky

- Automatické pipety;
- Eppendorfova zkumavka;
- Pasteurova pipeta;
- plastové špičky;
- zkumavky.

4.4 Přístroje

K přípravě vzorku a následnému měření byl využit box s laminárním prouděním, vortex, centrifuga a průtokový cytometr.

4.4.1 Box s laminárním prouděním

Laminární box je laboratorní zařízení, sloužící k filtraci vzduchu pomocí speciálních filtrů a HEPA-filtrů, čímž je zajištěna práce ve sterilním prostředí. Pro barvení povrchových a intracelulárních antigenů T regulačních buněk by nebylo nezbytně nutné pracovat ve sterilním prostředí laminárního boxu, ale při práci v něm jsou protilátky chráněny před znečištěním částicemi a bakteriemi. Byl použit laminární box: HOTTE MSC 12 STD GAZ, Jouan, Francie.



Obrázek 1 Box s laminárním prouděním [75]

4.4.2 Vortex

Vortex je laboratorní zařízení sloužící k intenzivnímu protřepání obsahu zkumavky. Byl použit vortex: Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., USA.



Obrázek 2 Vortex

4.4.3 Centrifuga

Centrifuga je rotační laboratorní zařízení, působící na vložený materiál odstředivou silou a tím dochází k separaci částic. Byla použita centrifuga: Universal 320R, Hettich, Spolková republika Německo.



Obrázek 3 Centrifuga

4.4.4 Průtokový cytometr

Průtokový cytometr je laboratorní zařízení, které měří různé buněčné populace. Nachází uplatnění ve výzkumných laboratořích i v klinické praxi, například v hematologické laboratoři se využívá při vyšetření krevního obrazu a v imunologické laboratoři, kde se mohou pomocí průtokového cytometru sledovat povrchové i intracelulární znaky buněk, počet buněčné populace, funkční parametry buněk, stupeň vyzrálosti a proliferace sledovaných buněk. Byl použit průtokový cytometr: BD FACS Canto™ II Flow Cytometer, BD Biosciences, USA.



Obrázek 4 Průtokový cytometr

4.5 Příprava vzorku

Příprava pupečnickové krve k měření v průtokovém cytometru spočívá v nabarvení povrchových a intracelulárních antigenů odpovídajících T regulačním buňkám.

Postup barvení antigenů byl použit na základě dlouholetých zkušeností Ústavu imunologie a mikrobiologie v Praze.

4.5.1 Barvení povrchových antigenů

- Do popsané zkumavky odpipetujeme 100 μ l pupečnickové krve.
- Přidáme 10 μ l mixu protilátek CD4 FITC/CD25 PE (dojde k obarvení všech T lymfocytů nesoucích povrchové znaky CD4 a CD25, nejen T regulačních buněk).
- Dobře promícháme pomocí vortexu a inkubujeme 10 minut ve tmě v lednici při teplotě 2-8 °C.

- Buňky promyjeme přidáním 2 *ml* studeného PBS a centrifugujeme při relativním odstředivém zrychlení 300 *g* po dobu 5 minut při 4 °C vychlazené centrifuze.
- Odsajeme všechnu supernatant Pasteurovou pipetou.
- Okamžitě pokračujeme barvením intracelulárních antigenů.

4.5.2 Barvení intracelulárních antigenů

- Přidáme 1 *ml* předem připraveného vychlazeného fixačního a lyzačního roztoku (při fixaci dojde k usmrcení buněk a lýza má za následek rozklad červených krvinek, tedy hemolýzu).
- Dobře promícháme pomocí pipety (několikrát opakujeme vysátí a nasátí roztoku) anebo vortexu a inkubujeme 10 minut ve tmě v lednici při teplotě 2-8 °C.
- Přidáme 0.5 *ml* permeabilizačního roztoku (roztok, který rozrušuje buněčnou membránu zafixovaných buněk, a tím umožňuje průnik barviva dovnitř buňky, aniž by došlo k jejímu zničení).
- Dobře promícháme pomocí vortexu a inkubujeme 10 minut ve tmě v lednici při teplotě 2-8 °C.
- Centrifugujeme při relativním odstředivém zrychlení 300-400 *g* po dobu 5 minut při 4 °C vychlazené centrifuze.
- Slijeme supernatant, zkumavku osušíme o buničinu.
- Resuspendujeme buňky v 50 μ *l* studeného blokačního pufru (blokuje zbývající vazebná místa na povrchu buňky, aby nedošlo k nespecifické vazbě protilátek), jemně zvortexujeme nebo promícháme.
- Přidáme 50 μ *l* PBS.
- Dobře promícháme pomocí vortexu a inkubujeme 5 minut ve tmě v lednici při teplotě 2-8 °C.
- Přidáme 5 μ *l* protilátek FoxP3 APC a Helios (dojde k obarvení T regulačních buněk, které obsahují tyto transkripční faktory).

- Dobře promícháme pomocí vortexu a inkubujeme 30 minut ve tmě v lednici při teplotě 2-8 °C.
- Buňky promyjeme dvakrát přidáním 2 ml studeného PBS a centrifugujeme při relativním odstředivém zrychlení 300 g po dobu 5 minut při 4 °C vychlazené centrifuze.
- Po centrifugaci slijeme supernatant, zkumavku osušíme o buničinu.
- Resuspedujeme peletu buněk v 300 μ l studeného PBS s 1 % formaldehydu.
- Okamžitě měříme na průtokovém cytometru, anebo můžeme vzorek uchovat po dobu 24 hodin v lednici při teplotě 2-8 °C.

4.6 Použité metody

4.6.1 Centrifugace

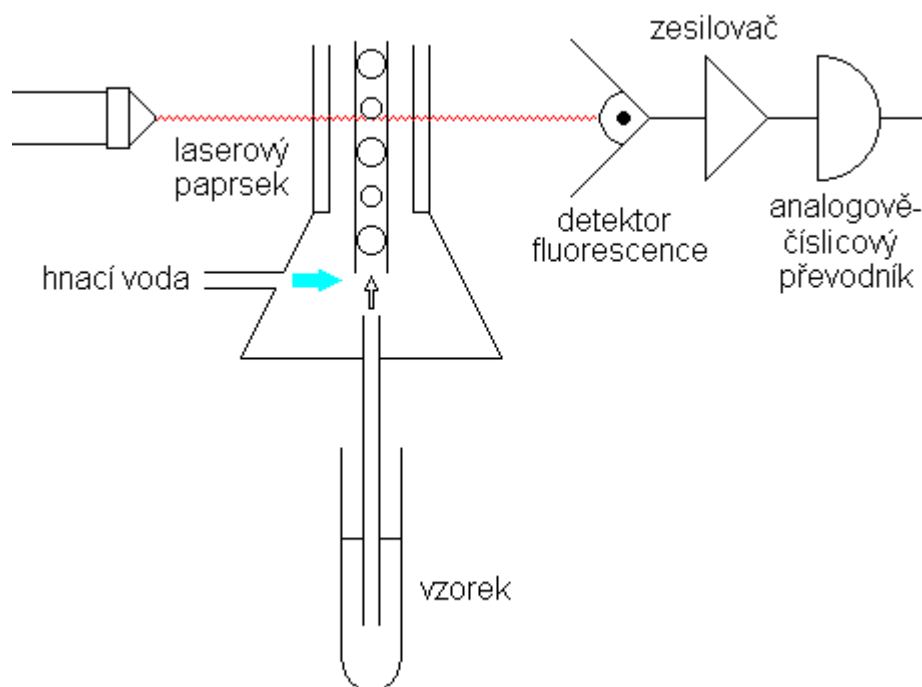
Centrifugace patří k tzv. separačním metodám. Centrifugace odděluje složky směsi v kapalném prostředí na základě jejich hustoty nebo velikosti vlivem odstředivého pole a zrychluje jejich sedimentaci, která by za normálních podmínek pouhou tíhovou silou probíhala příliš pomalu, anebo by neproběhla vůbec. Pořadí, ve kterém budou látky sedimentovat, je především závislé na rozdílu jejich hustot. Husté částice sedimentují první [76].

Sedimentaci neovlivňují pouze fyzikální vlastnosti částic, jako je velikost, hustota či tvar částice, ale ovlivňují i vlastnosti prostředí a samotné podmínky, za kterých centrifugace probíhá (počet otáček za minutu, relativní odstředivé zrychlení, doba centrifugování, ale i teplota v centrifuze) [76].

4.6.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je technika, která měří jednotlivé buňky v pohybu. Materiál pro průtokovou cytometrii tvoří buňky rozptýlené v kapalině. Buňky jsou označeny monoklonálními protilátkami s navázaným fluorescenčním barvivem.

Protilátky se navážou na antigeny na povrchu nebo uvnitř buněk a fluorochromem dojde k vizualizaci buněk. Průtokový cytometr je tvořen třemi hlavními částmi, mezi které patří fluidika, optika a elektronika [5, 77].



Obrázek 5 Schéma průtokového cytometru [78]

Po označení buněk protilátkami s fluorescenční barvou se suspenze ve zkumavce vloží do průtokového cytometru. Vzorek ze zkumavky nasaje tenká kapilára a je následně vstřikován do středu hnací kapaliny, kde vytvoří tenký proud, ve kterém jsou buňky unášeny ideálně postupně jedna za druhou. Tento proud buněk protíná laser (nejčastěji argonový). Každá buňka v suspenzi odráží a rozptyluje světlo s jinou intenzitou. Pokud je buňka označená pomocí monoklonální protilátky s fluorochromem, dojde k excitaci fluorescenčního záření. Mezi základní měřené parametry patří FSC (forward scatter) – přímý rozptyl, který je přímo úměrný velikosti buněk a SSC (side scatter) – boční rozptyl, je ovlivněn komplexitou (granularitou) buněk, tudíž můžeme rozlišit různé buněčné populace. Signály z optiky jsou převedeny na elektrické impulsy, které jsou zpracovány a vyhodnoceny vhodným počítačovým programem [5, 77].

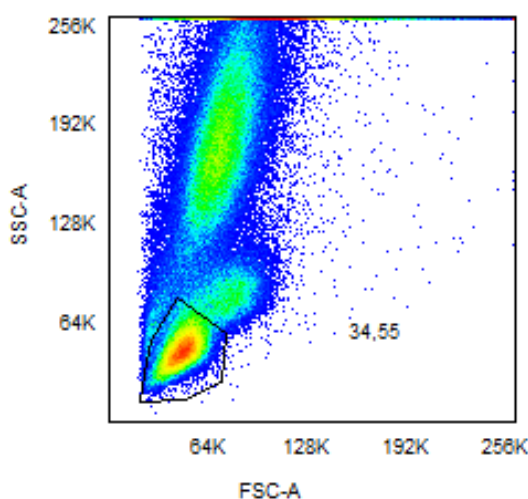
5 VÝSLEDKY

T regulační buňky byly izolovány *in vitro* z pupečnickové krve a byly podrobeny měření na průtokovém cytometru BD FACS Canto™ II v akvizičním programu BD FACS Diva 6.2 a analyzovány v programu FlowJo 8.2. K analýze byla použita pupečnicková krev 10 dětí zdravých matek a 10 dětí alergických matek.

Data byla zpracována a vyhodnocena v programu GraphPad 6. Rozdíly mezi skupinami byly porovnány pomocí dvouvýběrového parametrického t-testu, kde nulová hypotéza předpokládá rovnost středních hodnot. T-test byl zvolen na základě normální distribuce dat, což bylo ověřeno Fisherovým testem. Statistické testy slouží k porovnání, zda se výsledky měření jedné skupiny významně liší od výsledků naměřených u druhé skupiny. U statistických testů byla zvolena hladina významnosti $p = 0,05$. Písmeno H značí děti zdravých matek, zatímco písmeno A označuje děti alergických matek.

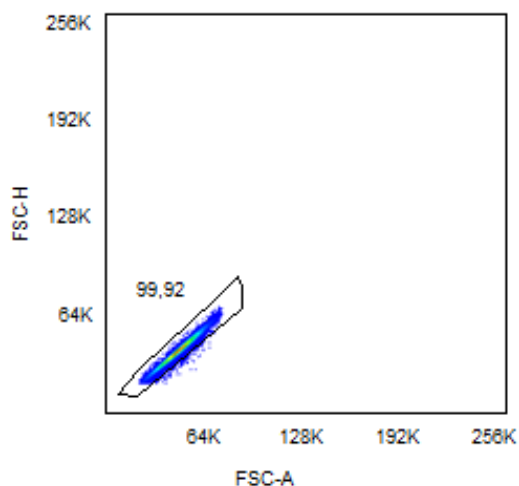
5.1 Ukázka strategie gatování

Detekce Treg průtokovou cytometrií vyžaduje výběr populace lymfocytů na základě velikosti a komplexity (dříve označováno granularity) buněk.



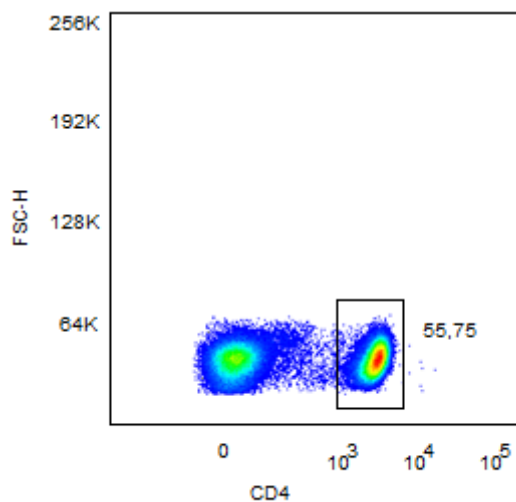
Obrázek 6 Výběr populace lymfocytů

Dále je nutné odstranit tzv. konfliktní případy (dvě buňky byly měřeny najednou).



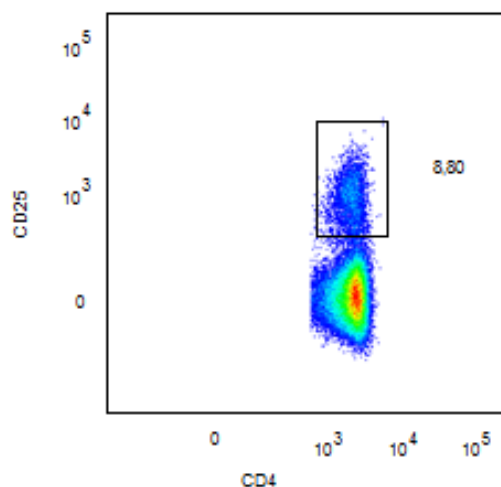
Obrázek 7 Odstranění doubletů

Selekce CD4 pozitivních T lymfocytů podle fluorochromu FITC.



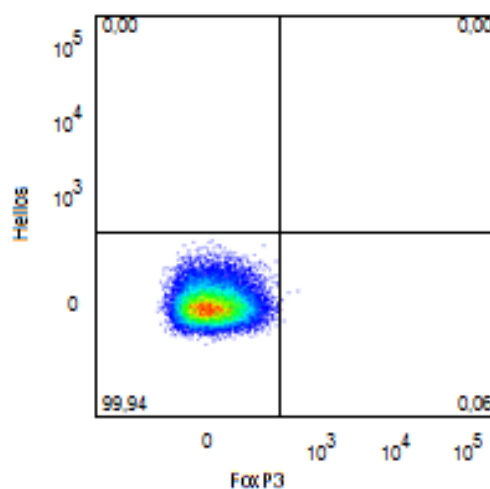
Obrázek 8 Výběr CD4 pozitivních T lymfocytů

Selekce CD4 pozitivních T lymfocytů podle fluorochromu FITC a CD25 pozitivních T lymfocytů podle fluorochromu PE.



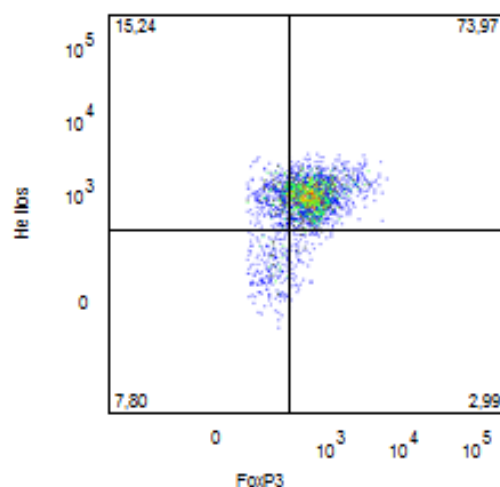
Obrázek 9 Výběr CD4CD25 pozitivních T lymfocytů

Následuje isotypová kontrola, která potvrzuje specifitu vazby protilátek FoxP3 a Helios.



Obrázek 10 Isotypová kontrola (Fluorescence Minus One-FMO)

Vymezení buněčné populace pozitivní na FoxP3 podle fluorochromu APC a Helios. Pravý horní kvadrant představuje 73,97 % buněk pozitivních na FoxP3 i Helios. 15,25 % buněk v levém horním kvadrantu je pozitivních pouze na Helios. 2,99 % buněk v pravém dolním kvadrantu je pozitivních pouze na FoxP3. 7,80 % buněk v levém dolním kvadrantu je negativní pro oba sledované znaky.



Obrázek 11 Vymezení buněčné populace pozitivní na FoxP3 a Helios

5.2 Vyhodnocení dat z průtokové cytometrie

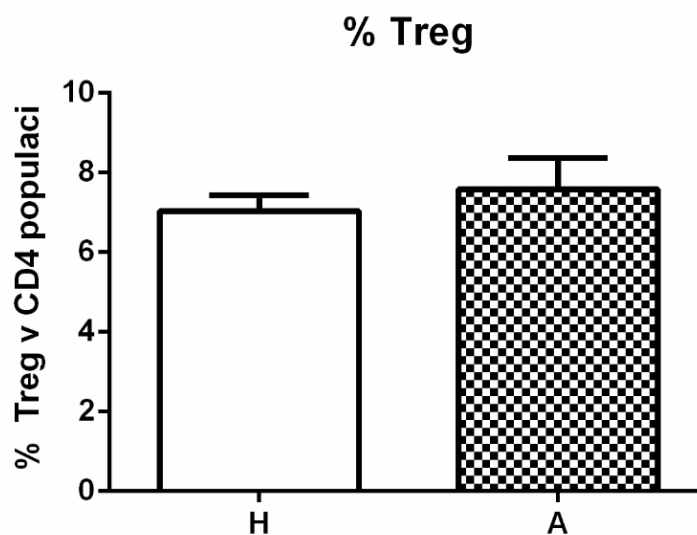
Tabulka 1 zobrazuje typ matčiny alergie, hodnoty Treg a mediánu fluorescenční intenzity (MFI) FoxP3 naměřené v pupečnickové krvi jejího dítěte.

Tabulka 1 Alergie matky a naměřené hodnoty Treg v pupečnickové krvi jejího dítěte

	Alergie matky	% CD4 CD25 FoxP3	% nTreg	MFI Foxp3	% iTreg
1	pyl, potraviny	4,8	4,7	2903	0,1
2	pyl	6,9	6,8	3402	0,1
3	antibiotika	10,3	10	4547	0,3
4	peří, prach	7,9	7,3	3043	0,7
5	celiakie, pyl	9	8,5	4274	0,5
6	potraviny	7,9	7,5	3092	0,4
7	pyl	4	3,8	4123	0,2
8	prach, včelí jed	11,3	11,3	3745	0
9	pyl	8,9	8,3	4404	0,6
10	antibiotika	4,9	4,1	3093	0,8

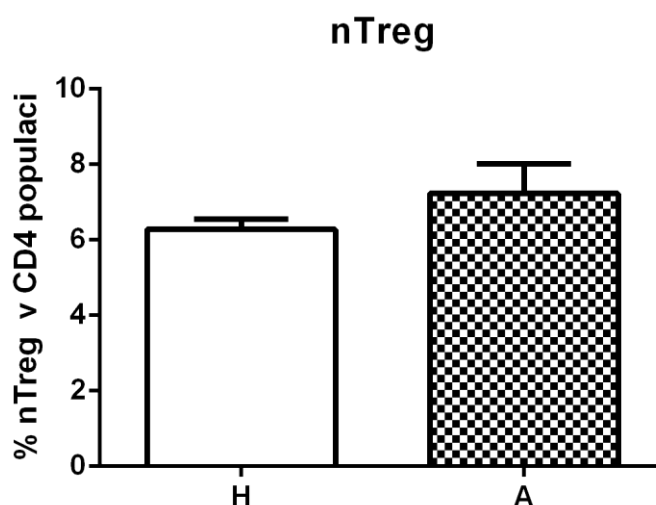
Obrázek 12 zobrazuje procentuální zastoupení CD4 CD25 FoxP3 T regulačních buněk. Sloupce zobrazují průměry hodnot s vyjádřenou střední chybou průměru. Sloupec H znázorňuje průměrnou hodnotu u dětí zdravých matek. Sloupec A

znázorňuje průměrnou hodnotu u dětí alergických matek. Hodnota $p=0,2657$ nezamítá nulovou hypotézu.



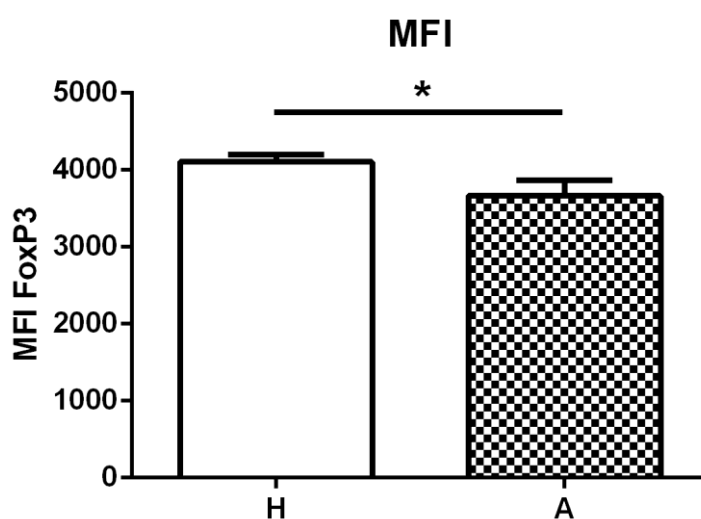
Obrázek 12 Procentuální zastoupení CD4 CD25 FoxP3 Treg

Obrázek 13 zobrazuje procentuální zastoupení nTreg. Sloupce zobrazují průměry hodnot s vyjádřenou střední chybou průměru. Sloupec H znázorňuje průměrnou hodnotu u dětí zdravých matek. Sloupec A znázorňuje průměrnou hodnotu u dětí alergických matek. Hodnota $p=0,1340$ nezamítá nulovou hypotézu.



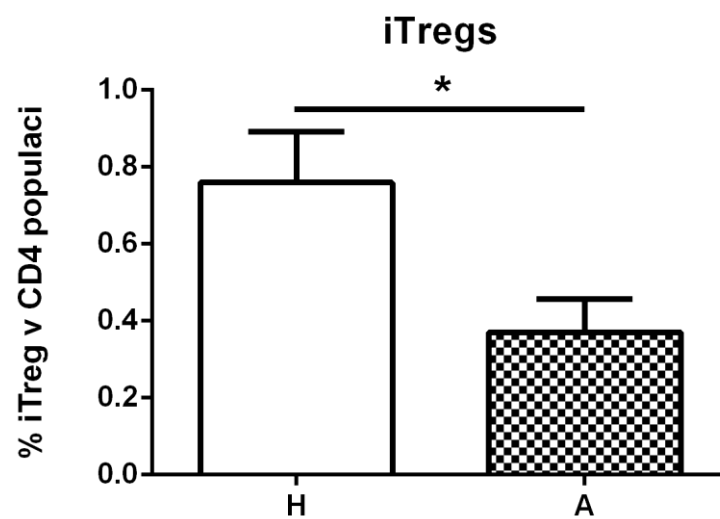
Obrázek 13 Procentuální zastoupení nTreg

Obrázek 14 zobrazuje medián fluorescenční intenzity FoxP3. Sloupce zobrazují průměry hodnot s vyjádřenou střední chybou průměru. Sloupec H znázorňuje průměrnou hodnotu u dětí zdravých matek. Sloupec A znázorňuje průměrnou hodnotu u dětí alergických matek. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdička označuje signifikantní hodnoty. Hodnota $p=0,0316$ zamítá nulovou hypotézu.



Obrázek 14 MFI FoxP3

Obrázek 15 zobrazuje procentuální zastoupení iTreg. Sloupce zobrazují průměry hodnot s vyjádřenou střední chybou průměru. Sloupec H znázorňuje průměrnou hodnotu u dětí zdravých matek. Sloupec A znázorňuje průměrnou hodnotu u dětí alergických matek. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny přímkou a hvězdička označuje signifikantní hodnoty. Hodnota $p=0,0119$ zamítá nulovou hypotézu.



Obrázek 15 Procentuální zastoupení iTreg

6 DISKUZE

Cílem praktické části bakalářské práce byla analýza, porovnání a prokázání rozdílů populace T regulačních buněk v pupečníkové krvi novorozenců zdravých matek (děti s relativně malou pravděpodobností rozvoje alergie) a novorozenců alergických matek (děti s relativně vysokou pravděpodobností rozvoje alergie). V pupečníkové krvi bylo testováno procentuální zastoupení CD4 CD25 FoxP3 pozitivních buněk, procentuální zastoupení přirozených T regulačních buněk, které jsou charakterizovány jako CD4 CD25 FoxP3 Helios. Dále byl testován medián fluorescenční intenzity FoxP3 a procentuální zastoupení indukovaných T regulačních buněk, které jsou charakterizovány jako CD4 CD25 FoxP3.

Vývoj fetálního imunitního systému ovlivňuje řada endogenních a exogenních faktorů (například nesprávná výživa matky během těhotenství, alergie matky), které působí ať už příznivě či nepříznivě na vyvíjející se imunitní systém plodu a jsou zodpovědné za stále častější výskyt onemocnění v raném dětství, včetně alergických onemocnění. Doba, kdy se plod vyvíjí *in utero* je kritický časový úsek a pravděpodobně má vliv na epigenetické změny vyvíjejícího se imunitního systému [25].

Alergická onemocnění patří mezi jedno z nejčastějších onemocnění dnešní doby s čím dál častějším a dřívejším výskytem, proto je důležité odhalit včasný prognostický znak poukazující na zvýšené riziko rozvoje alergie. Identifikace prognostického znaku by umožnila včasné zavedení preventivních opatření.

Většina studií se zaměřuje na porovnání imunologických parametrů v pupečníkové krvi novorozenců zdravých matek (děti s relativně nízkým rizikem vzniku alergie) a novorozenců alergických matek (děti s relativně vysokým rizikem vzniku alergie). Přestože matka i otec poskytuje dítěti stejný podíl genetické informace, tak se připouští, že imunitní systém matky má větší vliv

na imunitní, respektive alergický stav potomka, což je dáno tím, že mateřský imunitní systém interaguje s plodem během celého trvání těhotenství. Různé imunologické složky mohou přecházet z těla matky do těla plodu skrz placentu, i plodová voda ovlivňuje a upravuje imunitní systém plodu. Významný vliv na imunitní systém dítěte má i kojení [74].

T regulační buňky jsou zodpovědné za nastavení periferní tolerance vůči tělu vlastním tkáním (autoantigenům) a potlačování imunitní reakce vůči neškodným potravinovým a environmentálním antigenům, která by se bez nich zvrhla v nepřiměřenou. Zhoršená funkce Treg vede k autoimunitním onemocněním a k nepřiměřené imunitní reakci organismu na antigeny, což vede k rozvoji alergického onemocnění.

Přirozené T regulační buňky vznikají v thymu a jejich funkcí během alergické reakce je eliminace tvorby alergenně specifických protilátek typu IgE, indukce sekrece protilátek typu IgG4, potlačují degranulaci bazofilů, eozinofilů a žírných buněk. Indukované T regulační buňky vznikají v periférii a jejich uplatnění je během alergické reakce podobné s funkcí nTreg. Tr1 buňky se podílejí na mechanismu léčby alergie pomocí specifické alergenové imunoterapie, zejména potlačují degranulaci bazofilů, eozinofilů a žírných buněk [56].

Při preanalytické fázi vyšetření analyzovaného materiálu mohlo dojít k řadě chyb, které by ovlivnily výsledky měření průtokovým cytometrem. Chyby mohly být způsobeny nesprávným odběrem krve z pupečníku, nedodržením požadavků na transport do laboratoře, špatným uchováváním materiálu nebo při zpracování pupečnickové krve před vlastní analýzou.

Při zpracování krve mohou být případné chyby zaviněny lidským faktorem, ale i chybou přístrojů, například nepřesnou kalibrací pipety. Jako první chyba při zpracování vzorku se nabízí nepřesné napipetování požadovaného množství

pupečnickové krve (100 μ l) do zkumavky, což by způsobilo jiný než požadovaný poměr krve vůči přidaným činidlům, jenž může způsobit zkreslení průběhu analytické fáze. Při barvení extracelulárních a intracelulárních antigenů mohlo také dojít k řadě chyb, ať už zaviněných lidskou chybou či chybou použitého přístroje. Mezi možné chyby lze zařadit případné nedodržení pracovního postupu, ať už nedodržení pořadí anebo úplné vynechání mezikroků. Napipetování chemikálií ke vzorku krve v nesprávném množství nebo pořadí. Nedodržení optimálního času pro reakční dobu směsi, která byla kratší nebo naopak delší, než je doporučeno výrobcem kitu. Nastavení centrifugy mohlo být odlišné od doporučeného z důvodu nezapnutého chlazení centrifugy anebo nastavení jiné než předepsané teploty, trvání centrifugace kratší nebo delší čas i rozdílné nastavení relativního odstředivého zrychlení. Všechny výše vyjmenované chyby preanalytické fáze se podílejí na vzniku chyb a nepřesností analytické fáze měření.

Chyby analytické fáze by byly nejspíš chybou analyzátoru, v našem případě průtokového cytometru, ale ani chyba lidského faktoru se nedá vyloučit.

V postanalytické fázi mohla být chyba způsobena chybou ve vyhodnocovacím programu, popřípadě lidským faktorem, který nesprávně vyhodnotil výsledky v tomto programu. Nepřesnost mohla nastat i ve špatně zvoleném statistickém testu, kde hraje roli počet zkoumaných subjektů, který byl v tomto případě malý (10 jedinců od zdravých matek, 10 jedinců od alergických matek) a díky tomu nebyl detekován signifikantní rozdíl mezi skupinami, který by byl významný u větší skupiny testovaných jedinců.

Použitím výše uvedené gatovací strategie při analýze výsledků a použitím protilátek proti antigenům CD4 CD25 a FoxP3 nebyl nalezen signifikantní rozdíl v procentuálním zastoupení celkových T regulačních buněk v pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek, i když bylo patrné vyšší procentuální zastoupení celkových Treg u dětí alergických matek ($p = 0,2657$).

U přirozených Treg, které jsou charakteristické jako CD4 CD25 FoxP3 a Helios nebyl nalezen signifikantní rozdíl v procentuálním zastoupení nTreg v pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek, i když bylo patrné vyšší procentuální zastoupení nTreg u dětí alergických matek ($p = 0,1340$). Do dnešní doby ještě nebyla publikována studie, která odlišuje nTreg od iTreg pomocí transkripčního faktoru HELIOS v pupečnickové krvi, čímž se tahle studie odlišuje od jiných.

Signifikantní rozdíl v procentuálním zastoupení byl pozorován pouze u indukovaných Treg v pupečnickové krvi novorozenců zdravých a alergických matek, které jsou charakteristické jako CD4 CD25 a FoxP3. Novorozenci zdravých matek měli významně zvýšený podíl iTreg oproti novorozencům alergických matek ($p = 0,0119$). Navíc právě vyšší procentuální zastoupení iTregs u dětí zdravých matek by mohlo naznačovat pokročilejší vyžrálost imunitního systému novorozenců. Jelikož iTreg vznikají v periférii na rozdíl od nTreg, které se vyvíjejí v thymu a mohou nést TCR rozpoznávající autoantigeny. Prescott [79] popisuje asociaci opožděného vyžrávání imunitního systému spolu s déle trvající převahou Th2 imunitní odpovědi s pozdějším rozvojem alergických onemocnění u těchto dětí.

T regulační buňky jsou velmi heterogenní skupina buněk. Použitím různých gatovacích strategií společně s použitím jiných identifikačních znaků by mohlo vést k zjištění rozdílných výsledků u pozorovaných skupin viz Hrdý 2012 [35].

Transkripční faktor FoxP3 je hlavní identifikační znak T regulačních lymfocytů, protože CD25 mohou exprimovat všechny CD4 T lymfocyty. U novorozenců zdravých matek byl detekován signifikantně vyšší medián fluorescenční intenzity FoxP3 než u novorozenců alergických matek ($p = 0,0316$).

Signifikantně snížený MFI Foxp3 poukazuje na nižší funkční vlastnosti T regulačních buněk a zvýšený počet celkových Treg v pupečnickové krvi dětí alergických matek znamená snahu o určitou kompenzaci jejich nižších funkčních vlastností. Signifikantně nižší počet iTreg v pupečnickové krvi dětí alergických matek značí nižší vyzrálост imunitního systému predisponovaných dětí. Nižší funkčnost Treg by mohla být prokázána i nižší tvorbou intracelulárních cytokinů IL-10 a TGF- β (viz Hrdý 2012 [35]) v pupečnickové krvi novorozenců alergických matek. Kromě toho, použití různých klonů protilátek FoxP3 (při tomto měření byl použit klon protilátky FoxP3 3G3) může vést k různým poměrům měřených Treg.

Hrdý a kol. ve své studii [35] prokázal signifikantně zvýšený počet T regulačních buněk detekovaných pouze na základě znaků CD4 a CD25 u dětí alergických matek. Výše uvedený fenotyp je charakteristický nejen pro Treg, ale i pro různé subpopulace aktivovaných T lymfocytů. Pouze 2–4 % buněk produkujících nejvyšší hladiny CD25 mohou být považovány za Treg. Při detekci se zaměřením pouze na znaky CD4 a CD25 by měla být zohledněna tato skutečnost. Hrdý také prokázal snížený medián fluorescenční intenzity FoxP3 u dětí alergických matek, což společně se sníženou intracelulární přítomností regulačních cytokinů IL-10 a TGF- β poukazuje na sníženou funkčnost Treg kompenzovanou jejich zvýšeným počtem.

Smith ve své studii [68] testovala imunitní funkce CD4 CD25 CD127^{low} Treg a prokázala jejich sníženou funkci v pupečnickové krvi novorozenců, u nichž se v průběhu prvního roku života objevila alergie na vejce. Buňky dětí, u kterých došlo k rozvoji alergického onemocnění, vykazovaly výrazně sníženou schopnost sekrece cytokinů IL-10, IL-13 a IFN- γ . V počtu CD4 CD25 CD127^{low} Treg a v expresi FoxP3 v pupečnickové krvi novorozenců u niž se projevila alergie na vejce a novorozenců bez alergie nebyl prokázán signifikantní rozdíl.

Ani Schaub ve své studii [80] neprokázala signifikantní rozdíl v transkripčním faktoru FoxP3 mezi dětmi zdravých a alergických matek, zatímco jiné studie poukazují na sníženou funkci T regulačních buněk právě na základě nižšího mediánu fluorescenční intenzity FoxP3 [81]. To lze vysvětlit malým počtem zkoumaných jedinců [68], anebo použitím jiných metod na stanovení FoxP3. Smith i Schaub [68, 80] použily k detekci FoxP3 kvantitativní PCR v reálném čase spojenou s reverzní transkripcí. Genová exprese FoxP3 byla detekována na úrovni mRNA, zatímco já i Hrdý [35] jsme detekovali protein FoxP3 průtokovou cytometrií. Schaub naznačuje [80], že hladina FoxP3 na úrovni mRNA není v závislosti na matčině alergii odlišně regulována.

Výsledky prezentované v rámci této bakalářské práce by mohly být ovlivněny malou velikostí zkoumané skupiny, anebo různou povahou alergie matky. Alergie matek spolu s naměřenými hodnotami v pupečnickové krvi jejich dětí jsou znázorněny v tabulce číslo 1.

Zjištěný nižší MFI FoxP3 Treg v pupečnickové krvi novorozenců alergických matek poukazuje na nižší funkční kapacitu těchto Treg oproti novorozencům zdravých matek. Nedostatečná funkce Treg může usnadnit indukci alergie nedostatečnou indukcí tolerance k relativně neškodným antigenům vnějšího prostředí (alergenům) u predisponovaných dětí. Pro ověření použití Treg jako vhodného časného prognostického znaku poukazujícího na zvýšené riziko vzniku alergie bude nutné sledovat predisponované děti dlouhodobě.

7 ZÁVĚR

T regulační buňky zastávají klíčovou roli při patogenezi alergického onemocnění, zejména během fáze senzibilizace. Kromě Treg existují i jiné regulační buňky například B regulační buňky, CD8 T regulační buňky či NKT regulační buňky, které mají také uplatnění při potlačení imunitní odpovědi.

Cílem bakalářské práce v teoretické části byl popis Treg a hlavním cílem experimentální části bylo prokázání rozdílného proporčního zastoupení a funkčních vlastností Treg v pupečnickové krvi novorozenců zdravých a alergických matek. Oba vytyčené cíle se podařilo splnit.

Treg byly analyzovány v pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek pomocí kombinace povrchového a intracelulárního barvení využitím průtokové cytometrie. Nebyly prokázány signifikantní rozdíly v proporčním zastoupení Treg (CD4 CD25 FoxP3) dětí zdravých a alergických matek. Děti alergických matek měly statisticky nevýznamně vyšší množství nTreg (CD4 CD25 FoxP3 Helios), signifikantně nižší množství iTreg (CD4 CD25 FoxP3) poukazujících na nižší vyzrálост imunitního systému. Rovněž děti alergických matek měly signifikantně nižší MFI transkripčního faktoru FoxP3 určujícího fenotyp Treg (CD4 CD25 FoxP3). Nižší MFI FoxP3 signalizuje sníženou funkčnost Treg u predisponovaných dětí (dětí alergických matek).

Pro ověření relevantnosti proporčního zastoupení a funkčních vlastností Treg jako prognostického znaku v rozvoji alergického onemocnění u dětí s nedostatečností Treg při narození, je plánováno prospektivní sledování dětí za účelem zjištění, zda u těchto dětí dojde k rozvoji alergického onemocnění.

Předpokládá se, že vyšší zastoupení celkových Tregs v pupečnickové krvi dětí alergických matek by mohlo kompenzovat jejich snížené funkční vlastnosti.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APC	Allophycocyanin
APC	antigen prezentující buňka
BAL	bronchoalveolární laváž
BCR	receptor B lymfocytů pro antigen
CD	diferenciační antigen
CLP	lymfoidní progenitor
CTLA-4	z angl. cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
DC	dendritická buňka
DTH	z angl. delayed type hypersensitivity
FcεRI	vysokoafinitní receptor pro IgE
FITC	Fluoresceisothiocyanate
FoxP3	z angl. forkhead box P3
FSC	z angl. forward scatter
g	jednotka relativního odstředivého zrychlení
GITR	z angl. glukokortikoid-induced tumor necrosis factor receptor
gp	glykoprotein

HCl	kyselina chlorovodíková
HEPA	z angl. high efficiency particulate air filter
IFN	interferon
IgA	imunoglobulin A
IgE	imunoglobulin E
IgD	imunoglobulin D
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
ILC	přirozená lymfoidní buňka
IgM	imunoglobulin M
IP I	imunopatologická reakce I. typu
IS	imunitní systém
iTreg	indukované T regulační buňky
iTR35	T reg vzniklé při léčbě naivních T lymfocytů s IL-35
KCl	chlorid draselný
KH ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan draselný
MALT	slizniční imunitní systém

mDC	myeoidní dendritická buňka
MFI	z angl. mean fluorescence intensity
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
ml	mililitr
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NaCl	chlorid sodný
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	dihydrát hydrogenfosforečnanu disodného
NK	přirozený zabíječ
NKT	T lymfocyt s vlastnostmi NK buněk
nTreg	přirozené T regulační buňky
PBS	fosfátový roztok s příměsí chloridu sodného
PCR	polymerázová řetězová reakce
pDC	plazmacytoidní dendritická buňka
PE	Phycoerythrin
ROR γ t	z angl. retinoic acid receptor-related-orphan receptor gamma
SSC	z angl. side scatter
T-bet	z angl. T-box expressed in T cells

Tc	cytotoxický T lymfocyt
TCR	receptor T lymfocytů pro antigen
TGF	transformující růstový faktor
Th	pomocný T lymfocyt
Treg	regulační T lymfocyt
Tr1	regulační T buňky 1
°C	stupeň celsia
μl	mikrolitr

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. FERENČÍK, M., ROVENSKÝ, J. a kol. *IMUNITNÍ SYSTÉM: INFORMACE PRO KAŽDÉHO*. Praha: GRADA, 2005, 236. ISBN 80-247-1196-6.
2. SCHULTZ, K. T. a GRIEDER, F. Structure and function of the immune system. *Toxicologic Pathology* [online]. 1987, **15**(3), 262-264 [cit. 2017-01-09]. DOI: 10.1177/019262338701500301. ISSN 0192-6233. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/019262338701500301>
3. HOŘEJŠÍ, V. a BARTUŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009, 316 s. ISBN 978-80-7387-280-9.
4. ŠTERZL, I. a kolektiv autorů. *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékaře*. Praha: Karolinum, 2005, 207 s. ISBN 80-246-0972-X.
5. BARTUŇKOVÁ, J. a PAULÍK, M. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011, 176 s. ISBN 978-80-247-3533-7.
6. PETRŮ, V. a kolektiv. *Dětská alergologie*. Praha: Mladá fronta, 2012, 531 s. Aeskulap. ISBN 978-80-204-2584-3.
7. Dendritic Cells Initiate the Immune Response. *The Rockefeller University* [online]. New York, 2015 [cit. 2017-03-31]. Dostupné z: http://lab.rockefeller.edu/steinman/dendritic_intro/immuneResponse
8. Migration of Dendritic Cells. *The Rockefeller University* [online]. New York, 2015 [cit. 2017-03-31]. Dostupné z: http://lab.rockefeller.edu/steinman/dendritic_intro/migrationDendritic
9. MOUREK, J. *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada, 2012, 222 s. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3918-2.
10. DYLEVSKÝ, I. *Funkční anatomie*. Praha: Grada, 2009, 532 s. ISBN 978-80-247-3240-4.
11. ŠTERZL, I. *Přehledná imunoendokrinologie: patofyziologie, diagnostika, terapie*. Praha: Maxdorf, 2006, 143 s. Jessenius. ISBN 80-734-5087-9.

12. ŠPIČÁK, V. a PANZNER, P. *Alergologie*. Praha: Galén, c2004, 348 s. ISBN 80-726-2265-X.
13. FERENČÍK, M. *Ilustrovaný slovník imunologie a alergologie*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, 2011, 364 s. ISBN 978-80-7262-762-2.
14. OBOKI, K., OHNO, T. et al. Th17 and Allergy. *Allergology International* [online]. 2008, 57(2), 121-134 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.2332/allergolint.R-07-160. Dostupné z: http://ac.els-cdn.com/S1323893015307632/1-s2.0-S1323893015307632-main.pdf?_tid=c5d12804-16e7-11e7-8fc1-00000aab0f27&acdnt=1491057217_4e5186244c5c8a9389e3332b3069c64b
15. SPITS, H. a CUPEDO, T. Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function. *Annual Review of Immunology* [online]. 2012, 30(2012), 647-675 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-075053. Dostupné z: http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-immunol-020711-075053?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed
16. SPITS, H., ARTIST, H. et al. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2013, 13(2), 145-149 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1038/nri3365. ISSN 1474-1733. Dostupné z: <http://www.nature.com/nri/journal/v13/n2/full/nri3365.html>
17. LUND, S., WALFORD, H. H. a DOHERTY, T. A. Type 2 Innate Lymphoid Cells in Allergic Disease. *Current Immunology Reviews* [online]. 2013, 9(4), 214-221 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.2174/1573395510666140304235916. ISSN 1875-631X. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4033554/>
18. WALKER, J. A., BARLOW, J. L. a MCKENZIE, A. N. J. Innate lymphoid cells — how did we miss them? *Nature Reviews Immunology* [online]. 2013, 13(1), 75-87 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1038/nri3349. ISSN 1474-1733. Dostupné z: <http://www.nature.com/nri/journal/v13/n2/full/nri3349.html>

19. BARLOW, J. L., BELLOSI, A. et al. Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2012, **129**(1), 191-198 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.09.041. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009167491101565X>
20. JÍLEK, P. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. 4. přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2014, 96 s. ISBN 978-80-247-4822-1.
21. HOŘEJŠÍ, V. *Jak (ne)funguje imunitní systém*. Praha: Academia, 2014, 19 s. Věda kolem nás. ISBN 978-80-904392-3-8.
22. SIMON, A. K., HOLLANDER, G. A. a MCMICHAEL, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *The Royal Society Publishing* [online]. 2015, **282**(1821) [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1098/rspb.2014.3085. Dostupné z: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/282/1821/20143085>
23. MOLD, J. E., MICHAËLSSON, J. et al. Maternal Alloantigens Promote the Development of Tolerogenic Fetal Regulatory T Cells in Utero. *Science: American Association for the Advancement of Science*. [online]. 2008, **322**(5907), 1562-1565 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1126/science.1164511. ISSN 1095-9203. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2648820/>
24. MOCKOVÁ, A. Ovlivnění vývoje imunity v prenatálním a perinatálním období. *Pediatric pro praxi* [online]. 2014, **15**(4), 197-200 [cit. 2017-03-29]. ISSN 1803-5264. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2014/04/04.pdf>
25. KHAN, T.K., PALMER, D. J. a PRESCOTT, S. L. In-utero exposures and the evolving epidemiology of paediatric allergy. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology* [online]. 2015, **15**(5), 402-408 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1097/ACI.0000000000000209. Dostupné z: <http://ovidsp.tx.ovid.com/sp-3.24.1b/ovidweb.cgi?QS2=434f4e1a73d37e8c504983e01e46c99ab6229ada671f2>

cc9a1665ea81bfa6006ee2d38adb55411170bc62e788b7649dd669dde538163393c
d6437e7100619878ad45bb663f4b7ebb627c8257747e22af50fe51c349bd8ce2af95
1ddf34110d8498ad1d27a8ba74eb11c701322f377f80f0556e5f446dc35520ceef418
91aa76558416b9cb6914b740abe54b18b703a7050a976a688585a92e3d230b6acd3
904527c0d6334939791022c346e5f828948b564690b5b8ba5881ca85e699a25b5269
81156b1b0bac199a0ffc2a920f93d83b13ed3c4eba1f388de9a9dcf092d22fe

26. HOLT, P. G. a JONES, C. A. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy: EUROPEAN JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY* [online]. 2000, **55**(8), 688-697 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1034/j.1398-9995.2000.00118.x. ISSN 1398-9995. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1398-9995.2000.00118.x/full>
27. NOUZA, K. Imunita v prenatální ontogenezi. *Medicína: ODBORNÉ FÓRUM LÉKAŘŮ A FARMACEUTŮ* [online]. 2001, **8**(6), 22-23 [cit. 2017-03-29]. Dostupné z: <http://www.zdrava-rodina.cz/med/med0601/med0631.html>
28. MCGOVERN, N., CHAN, J. K. Y a GINHOUX, F. Dendritic cells in humans—from fetus to adult. *International Immunology* [online]. 2015, **27**(2), 65-72 [cit. 2017-04-01]. DOI: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu091>. ISSN 1460-2377. Dostupné z: <https://academic.oup.com/intimm/article/27/2/65/2950836/Dendritic-cells-in-humans-from-fetus-to-adult>
29. HRDÝ, J., NOVOTNÁ, O., KOCOURKOVÁ, I. a PROKEŠOVÁ, L. Gene Expression of Subunits of the IL-12 Family Cytokines in moDCs Derived In Vitro from the Cord Blood of Children of Healthy and Allergic Mothers. *Folia Biologica* [online]. 2014, **60**(2), 74-82 [cit. 2017-04-01]. ISSN 2533-7602. Dostupné z: <http://fb.cuni.cz/file/5718/FB2014A0010.pdf>
30. BÁRCENA A. a MUENCH, M. O. Phenotypic and functional analysis of T-cell precursors in the human fetal liver and thymus: CD7 expression in the early stages of T-and myeloid-cell development. *Blood* [online]. 1993, **82**(11),

- 3401-3414 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/82/11/3401.full.pdf>
31. BURT, T. D. Fetal Regulatory T Cells and Peripheral Immune Tolerance in utero: Implications for Development and Disease. *American Journal of Reproductive Immunology* [online]. 2013, **69**(4), 346-358 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1111/aji.12083. ISSN 1600-0897. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3951896/>
32. GITLIN, D. a BIASUCCI, A. Development of γ G, γ A, γ M, β 1C/ β 1A, C'1 esterase inhibitor, ceruloplasmin, transferrin, hemopexin, haptoglobin, fibrinogen, plasminogen, α 1-antitrypsin, orosomucoid, β -lipoprotein, α 2-macroglobulin, and prealbumin in the human conceptus. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. 1969, **48**(8), 1433-1446 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1172/JCI106109. ISSN 1558-8238. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC322370/?page=1>
33. Allergy: Allergy facts. *MedicineNet* [online]. San Clemente: WebMD, 2017 [cit. 2017-03-03]. Dostupné z: <http://www.medicinenet.com/allergy/article.htm>
34. WU, L. C. a ZARRIN, A. A. The production and regulation of IgE by the immune system. *NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY* [online]. 2014, **14**(4), 247-259 [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1038/nri3632. ISSN 1474-1741. Dostupné z: <http://www.nature.com/nri/journal/v14/n4/full/nri3632.html>
35. HRDÝ, J., KOCOURKOVÁ, I. a PROKEŠOVÁ, L. Impaired function of regulatory T cells in cord blood of children of allergic mothers. *Clinical & Experimental Immunology* [online]. 2012, **170**(1), 10-17 [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04630.x. ISSN 1365-2249. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3444712/>
36. HARB, H., AMARASEKERA, M. et al. Epigenetic Regulation in Early Childhood: A Miniaturized and Validated Method to Assess Histone Acetylation. *International Archives of Allergy and Immunology* [online].

- 2015, **168**(3), 173-181 [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1159/000442158. ISSN 1423-0097. Dostupné z: <http://www.karger.com/Article/FullText/442158>
37. Type I hypersensitivity: Allergy. *Multimedia support in the education of clinical and health care disciplines: Portal of Faculty of Medicine in Bratislava, Comenius University* [online]. Bratislava: MEFANET, 2012 [cit. 2017-03-03]. Dostupné z: <https://portal.fmed.uniba.sk/articles.php?aid=197>
38. Type 1 hypersensitivity. *Revolvy: Expand your mind. Discover the world. Organize your knowledge.* [online]. [cit. 2017-03-04]. Dostupné z: https://www.revolvy.com/main/index.php?s=Type%20%20hypersensitivity&item_type=topic
39. GOULD, H. J. a SUTTON, B. J. THE BIOLOGY OF IGE AND THE BASIS OF ALLERGIC DISEASE. *Annual Review of Immunology* [online]. 2013, **21**, 579-628 [cit. 2017-03-04]. DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141103. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141103>
40. WARRINGTON, R., WATSON, W. et al. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology: Practical guide for allergy and immunology in Canada* [online]. 2011, **7 (Suppl 1): S1** [cit. 2017-03-04]. DOI: 10.1186/1710-1492-7-S1-S1. Dostupné z: <https://aacijournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1710-1492-7-S1-S1>
41. Effector mechanisms in allergic reactions. JANEWAY, C. A. et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* [online]. 5.th. edition. New York: Garland Science, 2001 [cit. 2017-03-04]. ISBN 0-8153-3642-X. ISSN 0171-2985. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27112/>
42. GERSHON, R. K. a KONDO, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology: British Society for*

- immunology* [online]. 1970, **18**(5), 723-737 [cit. 2017-02-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1455602/>
43. SAKAGUCHI, S., WING, K. a MIYARA, M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *European Journal of Immunology* [online]. 2007, **37**(1), 116-123 [cit. 2017-02-01]. DOI: 10.1002/eji.200737593. ISSN 1521-4141. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.200737593/pdf>
 44. MÖLLER, G. Do Suppressor T Cells Exist? *SCANDINAVIAN JOURNAL OF Immunology: AN INTERNATIONAL MONTHLY JOURNAL* [online]. 1988, **27**(3), 247-250 [cit. 2017-02-01]. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1988.tb02344.x. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3083.1988.tb02344.x/full>
 45. SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing 11-2 Receptor α -Chains (CD25): Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases. *The Journal of Immunology* [online]. 1995, **155**(3) [cit. 2017-02-01]. ISSN 1550-6606. Dostupné z: http://kendallasmith.com/pdf/Sakaguchi_Sakaguchi.pdf
 46. MACDONALD, T. T. Suppressor T cells, rebranded as regulatory T cells, emerge from the wilderness bearing surface markers. *Gut* [online]. 2002, **51**(3), 311-312 [cit. 2017-02-01]. ISSN 1468-3288. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1773337/#>
 47. SAKAGUCHI, S. The origin of FOXP3-expressing CD4⁺ regulatory T cells: thymus or periphery. *JCI: The journal of Clinical Investigation* [online]. 2003, **112**(9), 1310-1312 [cit. 2017-02-01]. DOI: 10.1172/JCI200320274. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228490/>
 48. FOXP3 gene. *Genetics Home Reference: Your Guide to Understanding Genetic Conditions* [online]. [cit. 2017-02-03]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/FOXP3#normalfunction>
 49. RUDENSKY, A. Y. Regulatory T Cells and Foxp3. *Immunological Reviews* [online]. 2011, **241**(1), 260-268 [cit. 2017-02-03]. DOI: 10.1111/j.1600-

065X.2011.01018.x. ISSN 1600-065X. Dostupné
z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3077798/>

50. SAKAGUCHI, S., YAMAGUCHI, T. et al. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* [online]. 2008, **133**(5), 775-787 [cit. 2017-02-03]. DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.009. Dostupné
z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867408006247>
51. SAKAGUCHI, S. Regulatory T Cells: Key Controllers of Immunologic Self-Tolerance. *Cell* [online]. 2000, **101**(5), 455-458 [cit. 2017-02-03]. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80856-9. Dostupné
z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400808569>
52. KLABUSAY, M. Úloha regulačních T buněk v protinádorové imunitní odpovědi. *Klinická onkologie* [online]. 2015, **28**(4), 23-27 [cit. 2017-02-03]. DOI: 10.14735/amko20154S23. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/199/4834.pdf>
53. BETTINI, M. L. a VIGNALI, D. A. A. Development of Thymically-Derived Natural Regulatory T Cells. *ANNALS of THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCE* [online]. 2010, **1183**(The year in immunology 2), 1-12 [cit. 2017-02-05]. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05129.x. Dostupné
z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2925080/>
54. PACHOLCZYK, R. a KERN, J. The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells. *Immunology: British Society for immunology* [online]. 2008, **125**(4), 450-458 [cit. 2017-02-05]. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.02992.x. Dostupné
z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2612558/>
55. LIO, Ch.-W. J. a HSIEH, Ch.-S. A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development. *Immunity* [online]. 2008, **28**(1), 100-111 [cit. 2017-02-05]. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.11.021. ISSN 1074-7613. Dostupné
z: [http://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(07\)00586-9](http://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(07)00586-9)
56. ZHANG, H., KONG, H. et al. Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2014, **12**(125) [cit. 2017-02-

- 05]. DOI: 10.1186/1479-5876-12-125. ISSN 1479-5876. Dostupné z: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-12-125>
57. GOL-ARA, M., JADIDI-NIARAGH, F. et al. The Role of Different Subsets of Regulatory T Cells in Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis* [online]. 2012, **2012** [cit. 2017-02-06]. DOI: 10.1155/2012/805875. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/arthritis/2012/805875/>
58. SIMONETTA, F., CHIALI, A. et al. Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells. *European Journal of Immunology* [online]. 2012, **40**(9), 2528-2538 [cit. 2017-02-06]. DOI: 10.1002/eji.201040531. ISSN 1521-4141. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201040531/full>
59. THORNTON, A. M., KORTY, P. E. et al. Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3+ T Regulatory Cells. *The Journal of immunology* [online]. 2010, **184**(7), 3433-3441 [cit. 2017-02-06]. DOI: 10.4049/jimmunol.0904028. ISSN 1550-6606. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3725574/>
60. SCHMITT, E. G. a WILLIAMS, C. B. Generation and Function of Induced Regulatory T Cells. *Frontiers in IMMUNOLOGY* [online]. 2013, **4** [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00152. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3685796/>
61. ZHENG, S. G., WANG, J. H, et al. TGF- β Requires CTLA-4 Early after T Cell Activation to Induce FoxP3 and Generate Adaptive CD4+CD25+ Regulatory Cells. *The Journal of Immunology* [online]. 2006, **176**(6), 3321-3329 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.4049/jimmunol.176.6.3321. ISSN 1550-6606. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/content/176/6/3321.full>

62. RONZAROLO, M. G., GREGORI, S. et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological Reviews* [online]. 2006, **212**(1), 28-50 [cit. 2017-02-20]. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x. ISSN 1600-065X. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x/full>
63. POT, C., APETOH, L. a KUCHROO, V. K. Type 1 Regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity. *Seminars in Immunology* [online]. 2011, **23**(3), 202-208 [cit. 2017-02-20]. DOI: 10.1016/j.smim.2011.07.005. ISSN 1044-5323. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3178065/>
64. MOOTE, W. a KIM, H. Allergen-specific immunotherapy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology: Practical guide for allergy and immunology in Canada* [online]. 2011, **7 (Suppl 1)** [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1186/1710-1492-7-S1-S5. Dostupné z: <https://aacijournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1710-1492-7-S1-S5>
65. PANZER, P. Specifická alergenová imunoterapie. *Postgraduální medicína* [online]. 2004, **5** [cit. 2017-02-25]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/specificka-alergenova-imunoterapie-163576>
66. WEINER, H. L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells. *Immunological Reviews* [online]. 2001, **182**(1), 207-214 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1034/j.1600-065X.2001.1820117.x. ISSN 1600-065X. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-065X.2001.1820117.x/pdf>
67. COLLISON, L. W. et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *NATURE IMMUNOLOGY* [online]. 2010, **11**(12), 1093-1101 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1038/ni.1952. ISSN 1529-2916. Dostupné z: <https://www.dartmouth.edu/~turklab/Papers/Collison%20et%20al.,%20Nat%20Immunol,%202010.pdf>

68. SMITH, M., TOURIGNY, M. R. et al. Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4+CD25+CD127^{lo/-} regulatory T cell function. *THE JOURNAL OF Allergy AND Clinical Immunology* [online]. 2008, **121**(6), 1460-1466 [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.1016/j.jaci.2008.03.025. Dostupné z: [http://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(08\)00609-X/pdf](http://www.jacionline.org/article/S0091-6749(08)00609-X/pdf)
69. PELLERIN, L., JENKS, J. A. et al. Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy. *Immunologic Research* [online]. 2014, **58**(2-3), 358-368 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1007/s12026-014-8512-5. ISSN 1559-0755. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4161462/>
70. PALOMARES, O., YAMAN G. et al. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *European Journal of Immunology* [online]. 2010, **40**(5), 1232-1240 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1002/eji.200940045. ISSN 1521-4141. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.200940045/full>
71. AGUA-DOCE, A. a GRACA, L. Regulatory T Cells and the Control of the Allergic Response. *Journal of Allergy* [online]. 2012, **2012** [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.1155/2012/948901. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/ja/2012/948901>
72. CHAMBERS, E. S. a HAWRYLOWICZ, C. M. The Impact of Vitamin D on Regulatory T Cells. *Current Allergy and Asthma Reports* [online]. 2011, **11**(1), 29-36 [cit. 2017-03-25]. DOI: 10.1007/s11882-010-0161-8. ISSN 1534-6315. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11882-010-0161-8>
73. LODINOVÁ-ŽÁDNÍKOVÁ, R., PROKEŠOVÁ, L., KOCOURKOVÁ I., HRDÝ J. a ŽIŽKA, J. Prevention of Allergy in Infants of Allergic Mothers by Probiotic Escherichia coli. *International Archives of Allergy and Immunology* [online]. 2010, **153**(2), 201-206 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1159/000312638. ISSN 1423-0097. Dostupné z: <http://www.karger.com/Article/Abstract/312638>
74. HRDÝ, J. *Immunologic Characteristics of Cord Blood in Children with Increased Risk of Allergy Development Preventive Use of Probiotics*. Praha, 2012. Disertace.

Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta. Vedoucí práce Prof. MUDr. Ludmila Prokešová, CSc.

75. Přístroje: Lainární box Jouan. In: *Nemocnice Kyjov* [online]. Kyjov, [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://www.nemkyj.cz/pristroje>
76. ŠMARDA, J. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
77. Chapter 2: The Flow Cytometer. *Flow Cytometry - A Basic Introduction* [online]. 2008 [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: <http://flowbook.denovosoftware.com/chapter-2-flow-cytometer>
78. Princip průtokové cytometrie. In: *Laboratoř AIDS a infekční imunologie* [online]. Praha, 2008 [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/flowcyt1.htm>
79. PRESCOTT, S. L., KING, B. et al. The value of perinatal immune responses in predicting allergic disease at 6 years of age. *Allergy: EUROPEAN JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY* [online]. 2003, **58**(11), 1187-1194 [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1034/j.1398-9995.2003.00263.x. ISSN 1398-9995. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1398-9995.2003.00263.x/abstract>
80. SCHAUB, B., LIU, J. et al. Impairment of T-regulatory cells in cord blood of atopic mothers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2008, **121**(6), 1491-1499 [cit. 2017-04-29]. DOI: 10.1016/j.jaci.2008.04.010. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674908007264>
81. STEINBORN, A., ENGST M. et al. Small for gestational age (SGA) neonates show reduced suppressive activity of their regulatory T cells. *Clinical Immunology* [online]. 2010, **134**(2), 188-197 [cit. 2017-04-29]. DOI: 10.1016/j.clim.2009.09.003 Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661609008018>

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Box s laminárním prouděním.....	38
Obrázek 2 Vortex	38
Obrázek 3 Centrifuga.....	39
Obrázek 4 Průtokový cytometr	40
Obrázek 5 Schéma průtokového cytometru	43
Obrázek 6 Výběr populace T lymfocytů	44
Obrázek 7 Odstranění doubletů.....	45
Obrázek 8 Výběr CD4 pozitivních T lymfocytů	45
Obrázek 9 Výběr CD4 CD25 pozitivních T lymfocytů	46
Obrázek 10 Isotypová kontrola (Fluorescence minus one-FMO)	46
Obrázek 11 Vymezení buněčné populace pozitivní na FoxP3 a Helios	47
Obrázek 12 Procentuální zastoupení CD4 CD25 FoxP3 Treg	48
Obrázek 13 Procentuální zastoupení nTreg	48
Obrázek 14 MFI FoxP3	49
Obrázek 15 Procentuální zastoupení iTreg.....	50

11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Alergie matky a naměřené hodnoty Treg v pupečníkové krvi jejího dítěte.....	47
---	----